

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 414 286**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008 E 08709576 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2129797**

(54) Título: **Detección de ácidos nucleicos**

(30) Prioridad:

01.03.2007 GB 0703996

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

18.07.2013

(73) Titular/es:

**360 GENOMICS LIMITED (100.0%)
Avon House, 19 Stanwell Road, Penarth
Cardiff CF64 2EZ, GB**

(72) Inventor/es:

FU, GUOLIANG

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 414 286 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de ácidos nucleicos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere al campo de la detección y el enriquecimiento de un ácido nucleico deseado a partir de una población de ácidos nucleicos en una muestra, especialmente al enriquecimiento de ácidos nucleicos raros que contienen mutaciones.

10 [0002] Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son el tipo de variación más común en el genoma humano. Por lo general, las mutaciones puntuales son también SNP, pero el término mutación se reserva normalmente para aquellos SNP con una frecuencia inferior al 1% y/o los casos en que se conoce una asociación correlativa o funcional entre la mutación y una enfermedad (Gibson NJ, 2006 Clin. Chim. Acta 363(1-2): 32-47).
 15 Existen muchas aplicaciones para la genotipificación de polimorfismos y la detección de mutaciones raras. La detección de variantes raras es importante para la detección temprana de mutaciones patológicas, especialmente en el cáncer. Por ejemplo, la detección de mutaciones puntuales asociadas con el cáncer en muestras clínicas puede mejorar la identificación de la enfermedad residual mínima durante la quimioterapia y detectar la aparición de células tumorales en pacientes recidivantes. La detección de mutaciones puntuales raras también es importante para la evaluación de la exposición a mutágenos ambientales, para monitorizar la reparación del ADN endógeno y para estudiar la acumulación de mutaciones somáticas en individuos que envejecen. Adicionalmente, unos procedimientos más sensibles para la detección de variantes raras pueden revolucionar el diagnóstico prenatal, al permitir la caracterización de las células fetales presentes en la sangre materna. Se ha presentado un gran número de procedimientos, pero ninguno ha sido ampliamente aceptado. Muchos procedimientos para la detección de variantes poco frecuentes en el ADN genómico usan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar dianas mutantes y naturales. Los productos de PCR se analizan de diversos modos, que incluyen secuenciación, ligación de oligonucleótidos, digestión de restricción, espectrometría de masas o hibridación aleloespecífica, para identificar el producto variante frente a un fondo de ADN natural. Otros procedimientos usan PCR aleloespecífica para una amplificación selectiva a partir de la variante poco frecuente, con o sin una selección adicional. Por ejemplo, por digestión de los productos de PCR con una enzima de restricción que corta específicamente el producto natural. Las estrategias actuales tienen limitaciones intrínsecas debidas a la falta de especificidad total de los cebadores aleloespecíficos durante la PCR, lo que crea falsos positivos. Como resultado, todas las estrategias actuales tienen una sensibilidad y precisión limitadas (revisado en Jeffreys AJ y May CA, 2003 Genome Res. 13(10): 2316-24).

35 [0003] La mayoría de los sistemas de detección de mutaciones producen una señal de ensayo difícil de validar con respecto al número de moléculas mutantes detectadas. Esto puede superarse en parte mediante el análisis de muestras múltiples, en que cada una contiene una cantidad limitada de ADN (típicamente 50 equivalentes del genoma), para determinar el número de moléculas mutantes en la muestra. (PCR digital; Vogelstein y Kinzler, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(16): 9236-41). Sin embargo, es probable que el gran número de reacciones de PCR requeridas, combinado con el ruido de fondo a causa de la incorporación incorrecta de nucleótidos durante la PCR limiten esta estrategia a niveles de detección de aproximadamente una variante en una población de 1.000 ácidos nucleicos. Otra limitación de muchos procedimientos de detección de mutaciones es que sustituyen el sitio mutante por una secuencia cebadora de PCR y producen amplicones de poca longitud que contienen, si acaso, poca información además de la presencia de un supuesto alelo mutante (revisado en Jeffreys AJ y May CA, 2003).

50 [0004] El problema unificador detrás de todas estas estrategias de PCR para la detección de variantes raras es la falta de fidelidad de la replicación durante la amplificación. Jeffreys y May han proporcionado una solución mediante el enriquecimiento de las moléculas de ADN mutante a partir del ADN genómico antes de analizarlas por PCR; un procedimiento denominado enriquecimiento de ADN por hibridación aleloespecífica (DEASH) (Genome Research 13: 2316-2324, 2003). Este procedimiento es una modificación de las técnicas tradicionales de enriquecimiento de ácidos nucleicos que utilizan hibridación con sondas de ADN biotiniladas. El procedimiento usa oligonucleótidos aleloespecíficos para fraccionar las moléculas de ADN que difieren por la sustitución de una sola base. Sin embargo, este procedimiento de enriquecimiento de ADN implica etapas múltiples, requiere grandes cantidades de material de partida y adolece de baja sensibilidad y baja eficacia.

55 [0005] Otro procedimiento de enriquecimiento se basa en el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), en el que los productos amplificados por PCR se digieren con enzimas de restricción que pueden digerir selectivamente un alelo normal o un alelo mutado. La PCR enriquecida es una modificación introducida en el análisis de RFLP. El principio de esta estrategia es crear un sitio para una enzima de restricción solamente en las secuencias normales, lo que permite la digestión selectiva de los alelos normales amplificados en una primera etapa

de amplificación. Esto impide la amplificación posterior del ADN no mutante en una segunda etapa de amplificación, mientras que en la amplificación subsiguiente se enriquecen los alelos mutados (documento US n° 5.741.678; Kahn y col., 1991). Sin embargo, esta estrategia queda limitada al análisis de mutaciones en posiciones concretas en las que los sitios de enzimas de restricción se presentan de manera natural. Para superar esta limitación, es posible introducir artificialmente sitios de enzimas de restricción cerca del sitio de la mutación puntual para distinguir entre los alelos normal y mutante. En esta estrategia, se introducen sustituciones de pares de bases en los cebadores usados para la PCR, lo que da lugar a un sitio de enzima de restricción solamente cuando el cebador flanquea una mutación puntual específica. Esta estrategia permite la identificación selectiva de una mutación puntual en un sitio conocido, presumiblemente en cualquier gen.

[0006] La amplificación con apareamiento incorrecto del extremo 3' es una técnica de PCR que utiliza cebadores que han sido modificados en el extremo 3' para aparear solamente con una mutación puntual específica. Este procedimiento necesita condiciones que permitan la extensión a partir de cebadores con extremos 3' complementarios de apareamientos incorrectos específicos, mientras que las secuencias naturales no se extienden. Este procedimiento requiere cebadores específicos para cada mutación y las condiciones de la PCR son bastante rigurosas.

[0007] Recientemente, se han desarrollado procedimientos de enriquecimiento denominados PCR con cepo de APN (o de ANB) (PNA (o LNA) *clamp* PCR). Se usan análogos de ácidos nucleicos de alta afinidad como ácidos péptidonucleicos (APN) para inhibir la amplificación (patente de los EE. UU. n° 5.891.625). Sin embargo, estos procedimientos pueden ser problemáticos. Es difícil encontrar las condiciones óptimas para el cepo de APN/ANB; frecuentemente se requieren muchas pruebas y repetidos diseños y puede necesitarse la adquisición de instrumentos especiales. Además, los APN son costosos y difíciles de sintetizar y con frecuencia la eficacia de la inhibición es baja.

[0008] El documento EP1061135 se refiere a procedimientos para la detección e identificación de variaciones de secuencia en una secuencia de ácido nucleico de interés mediante un cebador detector. La publicación utiliza apareamientos incorrectos de diagnóstico entre el cebador detector y la diana donde estos se producen. El cebador detector hibrida con la secuencia de interés y se extiende con polimerasa. Por lo general, la eficacia de la extensión del cebador detector se detecta directamente como una indicación de la presencia y/o identidad de la variación de la secuencia en la diana.

[0009] No obstante, por lo tanto, se apreciará que la provisión de nuevos procedimientos y sondas adaptados al enriquecimiento y la detección sensibles de mutaciones puntuales raras sería una contribución a la técnica.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0010] Los procedimientos de la presente invención permiten el enriquecimiento y la detección rápidos, sensibles y mejorados de ácidos nucleicos deseados a partir de una población de ácidos nucleicos. La metodología y las sondas mejoradas también permiten la detección rápida y sensible de variaciones genéticas de ácidos nucleicos en muestras de pacientes con enfermedades genéticas o neoplasias.

[0011] Diversos aspectos de la invención se describen en los aspectos, realizaciones y reivindicaciones a continuación.

[0012] En general, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el enriquecimiento y/o la detección de un ácido nucleico deseado con una secuencia diana concreta (por ejemplo, al menos un nucleótido variante) a partir de una población de ácidos nucleicos en una muestra, en que dicho procedimiento se desvela en la reivindicación 1.

[0013] Por lo tanto, brevemente, en una realización preferida de la presente invención, la extensión del cebador de amplificación (y, por tanto, una amplificación exponencial) depende de que NO haya extensión a partir del cebador de enriquecimiento. De este modo, el cebador de enriquecimiento no extendido se disociará de la secuencia diana en las condiciones de extensión y permitirá así que la extensión del cebador de amplificación pase a través de la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante para que, preferentemente, tenga lugar una amplificación exponencial.

[0014] También se desvela un procedimiento en el que, en la etapa (a), el molde de ácido nucleico forma una estructura de horquilla en las condiciones de hibridación, en que la parte biciatenaria de la horquilla comprende un sitio de unión para un cebador de amplificación y el bucle de la horquilla comprende la secuencia de ácido nucleico diana, en que el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico en el bucle. En la etapa (b), el cebador de enriquecimiento se extiende cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene un nucleótido

variante; esta extensión abre la estructura de horquilla y permite así al cebador de amplificación hibridar con el sitio de unión del cebador en las condiciones de hibridación y promover la amplificación, mientras que el cebador de enriquecimiento no es extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico con un nucleótido normal, con lo que la estructura de horquilla se mantiene intacta e impide la hibridación del cebador de amplificación con el sitio de unión del cebador.

[0015] Por lo tanto, en las dos realizaciones hay dos cebadores de enriquecimiento diferentes, uno que se extiende cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene un nucleótido normal y otro que se extiende cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene un nucleótido variante.

[0016] En las dos realizaciones, la amplificación preferencial de la secuencia variante depende de la extensión de uno de los cebadores de enriquecimiento, pero no del otro.

[0017] Sin embargo, en la primera realización, la extensión del cebador de enriquecimiento "normal" es la que conduce en último término a la amplificación preferencial de la secuencia variante (al bloquear la extensión del cebador de amplificación hibridado con la diana "normal"), según se ilustra, por ejemplo, en la figura 1.

[0018] En la segunda realización, la extensión del cebador de enriquecimiento "variante" es la que conduce en último término a la amplificación preferencial de la secuencia variante (al permitir solamente la extensión del cebador de amplificación hibridado con la diana "variante"), según se ilustra, por ejemplo, en la figura 11.

[0019] Preferentemente, el producto de extensión del cebador de enriquecimiento en sí mismo se hace inadecuado para una amplificación exponencial, por ejemplo, al hacer dicho cebador de enriquecimiento inadecuado para la copia, ya sea por incorporación de una fracción apropiada o debido a su secuencia (que puede replegarse sobre sí misma para impedir la hibridación del cebador).

[0020] Según se describe a continuación, la extensión del cebador de enriquecimiento hibridado puede hacerse dependiente de la presencia del nucleótido normal o variante en el ácido nucleico diana de distintas maneras.

[0021] Por ejemplo, el cebador puede incluir en su extremo 3' un nucleótido complementario de la secuencia normal o natural. Esto se requiere para la extensión del cebador. En este contexto, se apreciará que cuando en algún aspecto o reivindicación en este documento se haga referencia al "nucleótido 3'-terminal" o al "extremo 3'", la invención puede ponerse en práctica igualmente con un nucleótido no terminal que esté lo suficientemente próximo al nucleótido terminal para conseguir el mismo efecto, es decir, para permitir o impedir la extensión cuando el cebador pertinente hibrida con la porción de diagnóstico que es complementaria o no complementaria, respectivamente. No obstante, típicamente, tales nucleótidos no terminales estarán separados del extremo solamente por uno, dos o tres nucleótidos.

[0022] Por ejemplo, el cebador puede incluir en su extremo 3' un nucleótido bloqueante que no es complementario de la secuencia normal o natural. Al aplicar las condiciones para eliminar este nucleótido terminal debido a su apareamiento incorrecto (por ejemplo, una polimerasa correctora), se obvia el efecto bloqueante y se permite la extensión.

[0023] Por ejemplo, el cebador puede incluir en su extremo 3' un nucleótido bloqueante que es complementario de la secuencia normal. Al aplicar las condiciones para eliminar este nucleótido terminal (por ejemplo, pirofosforolisis), se obvia el efecto bloqueante y se permite la extensión.

[0024] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la detección de un ácido nucleico diana, en que dicha detección tiene lugar por medio de una sonda puente que comprende al menos dos porciones de unión enlazadas por una porción de puente, en que la primera porción de unión es capaz de hibridar con una primera región de un molde de ácido nucleico, en que la segunda porción de unión es capaz de hibridar con una segunda región del molde de ácido nucleico adyacente o sustancialmente adyacente a la primera región del ácido nucleico molde, en que la primera región del ácido nucleico molde incluye el supuesto nucleótido variante.

[0025] La longitud y/o la composición de dicha porción de puente, combinadas con el grado de separación, en su caso, entre la primera región y la segunda región del ácido nucleico molde son capaces de regular la Tm (temperatura de fusión) de la porción de unión individual y/o la Tm de la sonda puente y estas variables pueden seleccionarse o adaptarse fácilmente a la luz de la presente descripción por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante software convencional.

[0026] La primera región de un molde de ácido nucleico puede ser una región en la secuencia diana extendida

de un producto de extensión de un cebador, en que dicha segunda región es una parte de un cebador de amplificación o una sonda.

5 [0027] En uso, una porción de unión de la sonda puente hibrida con el ácido nucleico diana a diferentes temperaturas de fusión que dependen de si la diana incluye nucleótidos complementarios o no complementarios. Las temperaturas se miden y son un indicio de la presencia o ausencia de un supuesto nucleótido variante.

10 [0028] La porción de puente comprende al menos un nucleótido o al menos una fracción química no nucleotídica.

15 [0029] La sonda puente y/o el cebador o la sonda pueden comprender marcadores de detección. La primera porción de unión está unida a uno o más primeros marcadores, la segunda porción de unión está unida a uno más segundos marcadores, en que dichos primeros marcadores y segundos marcadores son pares de desactivación por contacto, en que uno de los marcadores es un desactivador, en que al hibridar las sondas con la secuencia diana, los primeros y segundos marcadores quedan en una relación de desactivación por contacto. Alternativamente, la primera porción de unión está unida a un primer marcador y la segunda porción de unión está unida a un segundo marcador, en que dichos primer marcador y segundo marcador son pares de transferencia de energía de fluorescencia, en que, al hibridar las sondas con la secuencia diana, los marcadores primero y segundo quedan en una relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

20 [0030] La segunda porción de unión y la región del cebador que es capaz de hibridar con la segunda porción de unión de la sonda puente pueden estar unidas, respectivamente, a un miembro de un par formado por un fluoróforo y desactivador, de modo que, al hibridar la sonda puente con la secuencia diana, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto. Se prefiere que el desactivador no sea una entidad fluorescente. El desactivador puede ser una nanopartícula. El desactivador puede ser un resto G o múltiples restos G.

30 [0031] También se desvela un procedimiento para el análisis de una secuencia de ADN diana de una muestra biológica, en que dicho procedimiento comprende las etapas de

35 (a) adición a la muestra biológica de una cantidad eficaz de cebadores de amplificación y una sonda de ácido nucleico, en que uno de dichos cebadores de amplificación y la muestra están marcados, respectivamente, con un miembro de un par formado por un fluoróforo y un desactivador, de modo que, al hibridar las sondas con el producto amplificado que comprende el cebador de amplificación marcado, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto,

40 (b) amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana por un procedimiento de amplificación;

(c) iluminación de la muestra biológica con luz de una longitud de onda seleccionada que es absorbida por dicho fluoróforo; y

(d) detección de la emisión de fluorescencia de dicho fluoróforo o monitorización de la fluorescencia dependiente de la temperatura de dicho fluoróforo.

45 [0032] Por lo general, la sonda marcada hibridará con el producto amplificado en suficiente proximidad al cebador para conseguir esto y los expertos en la técnica serán capaces de dirigirla específicamente como corresponde dependiendo de los sitios marcados, por ejemplo, muy próxima dentro de la región extendida cerca del cebador y/o en parte hibridando con el cebador mismo. Típicamente, cinco o menos (por ejemplo, ninguno, uno, dos, tres o cuatro) nucleótidos separarán el extremo próximo de la sonda y el "extremo terminal" del cebador extendido en el producto de amplificación.

50 [0033] En otra realización, un procedimiento para el análisis de una secuencia de ADN diana de una muestra biológica comprende las etapas de

55 (a) adición a la muestra biológica de una cantidad eficaz de cebadores de amplificación y dos sondas de ácido nucleico que hibridan con regiones adyacentes de la secuencia diana, en que una de dichas sondas está marcada con un fluoróforo y la otra sonda está marcada con un desactivador de un par de desactivación por contacto, de modo que, al hibridar las sondas con el producto amplificado de la secuencia diana, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto, en que el fluoróforo y el desactivador se encuentran a una distancia de cinco nucleótidos entre sí;

60 (b) amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana por un procedimiento de amplificación;

(c) iluminación de la muestra biológica con luz de una longitud de onda seleccionada que es absorbida por dicho fluoróforo; y

- 5 (d) detección de la emisión de fluorescencia de dicho fluoróforo o monitorización de la fluorescencia dependiente de la temperatura de dicho fluoróforo.

[0034] Los procedimientos anteriores pueden comprender además la etapa de determinación de un perfil de fusión del dúplex formado por la sonda y la diana. Se prefiere que una de dichas sondas de ácido nucleico sea una sonda puente, la cual comprende al menos dos porciones de unión enlazadas por una porción de puente, en que la primera porción de unión es capaz de hibridar con una primera región de un ácido nucleico molde (en este caso: el producto amplificado de la secuencia diana), en que la segunda porción de unión es capaz de hibridar con una segunda región del ácido nucleico molde adyacente o sustancialmente adyacente a la primera región del ácido nucleico molde, en que dicha porción de puente comprende al menos un nucleótido o al menos una fracción química no nucleotídica que es incapaz de hibridar con el molde de ácido nucleico, en que la longitud y/o la composición de dicha porción de puente son uno de los factores que determinan la Tm de la porción de unión individual y/o la Tm de la sonda puente, en que la primera región del ácido nucleico molde incluye el supuesto nucleótido variante.

[0035] También se proporcionan procedimientos y materiales relacionados (por ejemplo, kits y sondas).

[0036] Todas las combinaciones de las diversas realizaciones y reivindicaciones (incluidas las reivindicaciones subordinadas) descritas a continuación se aplican, con los cambios necesarios, a los aspectos del procedimiento según se describe anteriormente.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0037]

30 La figura 1 es un diagrama esquemático de una realización de la presente invención que muestra la hibridación de un cebador de enriquecimiento con una región de diagnóstico, en que el nucleótido del extremo 3' (T, timidina) del cebador de enriquecimiento se aparea correctamente con el nucleótido normal (A, adenosina) y se aparea incorrectamente con el nucleótido variante (C, citidina) de una región de diagnóstico de la secuencia diana. El cebador de enriquecimiento hibridado se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido normal apropiado, lo que bloquea la extensión a partir de un cebador de amplificación anterior. El cebador de enriquecimiento hibridado no se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido variante y se disocia del molde, lo que permite que la extensión de un cebador de amplificación anterior pase a través de la región de diagnóstico. El producto de extensión del cebador de enriquecimiento puede copiarse parcialmente de manera lineal, mientras que el producto de extensión del cebador de amplificación puede amplificarse exponencialmente.

40 La figura 2 es un diagrama esquemático de una realización de la presente invención que muestra la hibridación de un cebador de enriquecimiento con una región de diagnóstico, en que el nucleótido del extremo 3' (G, guanina) del cebador de enriquecimiento, bloqueado por un grupo fosfato, se aparea correctamente con el nucleótido variante (C, citidina), mientras que se aparea incorrectamente con el nucleótido normal (A, adenosina) de la región de diagnóstico. Con el nucleótido G terminal eliminado por la actividad correctora de una ADN-polimerasa, el cebador de enriquecimiento hibridado se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido normal apropiado, lo que bloquea la extensión a partir de un cebador de amplificación anterior. El cebador de enriquecimiento hibridado no se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido variante y se disocia del molde, lo que permite que la extensión de un cebador de amplificación anterior pase a través de la región de diagnóstico. El producto de extensión del cebador de enriquecimiento puede copiarse parcialmente de manera lineal, mientras que el producto de extensión del cebador de amplificación puede amplificarse exponencialmente.

50 La figura 3 es un diagrama esquemático de una realización de la presente invención que muestra la hibridación de un cebador de enriquecimiento con una región de diagnóstico, en que el nucleótido del extremo 3' (ddT, monofosfato de didesoxitimidina) del cebador de enriquecimiento se aparea correctamente con el nucleótido normal (A, adenosina), mientras que se aparea incorrectamente con el nucleótido variante (C, citidina) de la región de diagnóstico. Después de eliminar el resto T terminal por la actividad de pirofosforolisis de una ADN-polimerasa, el cebador de enriquecimiento hibridado se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido normal apropiado, en que el producto de extensión del cebador de enriquecimiento bloquea la extensión de un cebador de amplificación anterior. El cebador de enriquecimiento hibridado no se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido variante y se disocia del molde, lo que permite que la extensión de un cebador de amplificación anterior pase a través de la región de diagnóstico. El producto de extensión del cebador de enriquecimiento puede copiarse parcialmente de manera lineal, mientras que el producto de extensión del cebador de amplificación puede amplificarse exponencialmente.

exponencialmente.

La figura 4 es un diagrama esquemático de una realización de la presente invención que muestra la hibridación de un cebador de enriquecimiento con una región de diagnóstico, en que el nucleótido del extremo 3' (T, timidina) del cebador de enriquecimiento se aparea correctamente con el nucleótido normal (A, adenosina) y se aparea incorrectamente con el nucleótido variante (C, citidina) de una región de diagnóstico de la secuencia diana. El cebador de enriquecimiento hibrido se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido normal apropiado en unas condiciones de extensión que comprenden al menos un trifosfato de desoxinucleósido modificado. El cebador de enriquecimiento dentro de la hebra extendida es degradado por una actividad exonucleasa 5' pero la hebra extendida (incluidos los trifosfatos de desoxinucleósidos modificados) es resistente al corte, con lo que se bloquea la extensión a partir de un cebador de amplificación anterior. El cebador de enriquecimiento hibrido no se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido variante y se disocia del molde, lo que permite que la extensión de un cebador de amplificación anterior pase a través de la región de diagnóstico. El producto (parcialmente degradado) de extensión del cebador de enriquecimiento puede copiarse parcialmente de manera lineal, mientras que el producto de extensión del cebador de amplificación puede amplificarse exponencialmente.

La figura 5 es un diagrama esquemático de una realización de la presente invención que muestra un cebador de enriquecimiento que comprende una secuencia de cola en el lado 5'. La secuencia de cola en el lado 5' es idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del segundo cebador de amplificación para la segunda hebra de la secuencia diana, que es complementaria a la primera hebra de la secuencia diana con la que son capaces de hibridar el cebador de enriquecimiento y el primer cebador de amplificación. El cebador de enriquecimiento hibrido con una región de diagnóstico, en que el nucleótido del extremo 3' (T, timidina) del cebador de enriquecimiento se aparea correctamente con el nucleótido normal (A, adenosina) y se aparea incorrectamente con el nucleótido variante (C, citidina) de una región de diagnóstico de la secuencia diana. El cebador de enriquecimiento hibrido se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido normal apropiado; la hebra extendida bloquea la extensión a partir de un cebador de amplificación anterior. El cebador de enriquecimiento hibrido no se extiende sobre el molde que contiene el nucleótido variante y se disocia del molde, lo que permite que la extensión de un cebador de amplificación anterior pase a través de la región de diagnóstico. El producto de extensión del cebador de enriquecimiento, sometido a condiciones de desnaturización e hibridación, se repliega para formar una estructura de horquilla que bloquea el sitio de unión del segundo cebador de amplificación, mientras que el producto de extensión del cebador de amplificación puede amplificarse exponencialmente.

La figura 6 ilustra diversas sondas puente hibridadas con ácidos nucleicos. (A) Los extremos de una sonda puente apuntan el uno al otro cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico diana. Los extremos de la sonda puente están unidos a marcadores diferentes. Cuando la sonda puente está hibridada con la diana, los dos marcadores quedan muy próximos. (B) Los extremos de una sonda puente apuntan en la misma dirección cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico diana. La sonda puente está unida a dos marcadores. Cuando la sonda puente está hibridada con la diana, los dos marcadores quedan muy próximos. (C) Los extremos de una sonda puente apuntan en direcciones opuestas entre sí cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico diana. Las porciones de unión están marcadas con marcadores diferentes. La hibridación hace que los dos marcadores queden muy próximos. (D) Las dos porciones de unión hibridan con la diana, en que la región de un ácido nucleico diana hibridada con la primera porción de unión se encuentra a cierta distancia de la región hibridada con la segunda porción de unión. (E) La sonda puente está marcada con el marcador 1 y otra sonda está marcada con el marcador 2. Cuando las dos sondas hibridan con la diana, los dos marcadores quedan muy próximos. (F) Dos sondas de ácido nucleico hibridan con regiones adyacentes de la secuencia diana, en que una de dichas sondas está marcada con un fluoróforo y la otra sonda está marcada con un desactivador de un par de desactivación por contacto, de modo que, al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto. (G), (H) e (I) Los cebadores de amplificación y una sonda de ácido nucleico que puede ser una sonda puente están marcados respectivamente con un miembro de un par formado por un fluoróforo y un desactivador, de modo que, al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto.

La figura 7 ilustra una reacción típica de un procedimiento de la presente invención para el enriquecimiento y la detección de una mutación puntual en una muestra. En la reacción, un primer cebador de amplificación y un cebador de enriquecimiento hibridan con la primera hebra de un ácido nucleico diana; un segundo cebador de amplificación y una sonda puente hibridan con la segunda hebra del ácido nucleico diana que es complementaria de la primera hebra del ácido nucleico diana. El cebador de enriquecimiento hibrida con una región de diagnóstico, en que el nucleótido del extremo 3' (T, timidina) del cebador de enriquecimiento se aparea correctamente con el nucleótido normal (A, adenosina) y se aparea incorrectamente con el nucleótido variante (C, citidina) de una región de diagnóstico de la secuencia diana. La primera porción de la sonda puente hibrida con la región de diagnóstico de la segunda hebra del ácido nucleico diana con un supuesto nucleótido variante. La segunda porción de unión de la sonda puente hibrida con una región diana que es adyacente a la región de diagnóstico en la segunda hebra de la

diana pero que no solapa o tiene un solapamiento limitado con la región de la diana cuya secuencia es sustancialmente idéntica a la secuencia del cebador de enriquecimiento. En otras palabras, la sonda puente y el cebador de enriquecimiento tienen no tienen ninguna complementariedad o esta es limitada, lo que evita que hibriden entre sí. La sonda puente está marcada y genera una señal detectable al hibridar con un ácido nucleico diana o al disociarse de un ácido nucleico diana. La sonda puente puede usarse para la detección en tiempo real durante la amplificación y el enriquecimiento o puede usarse en un análisis de curvas de fusión para la detección del punto final. La primera porción de unión de la sonda puente hibrida con un ácido nucleico diana perfectamente apareado o con un ácido nucleico diana incorrectamente apareado a diferentes temperaturas de fusión que se miden y son un indicio de la presencia o ausencia de un supuesto nucleótido variante.

La figura 8 ilustra un procedimiento que usa un conjunto de sondas puente para explorar mutaciones desconocidas.

La figura 9 muestra los resultados de los análisis de curvas de fusión de las sondas puente de los ejemplos 2 y 3.

La figura 10 muestra el uso de una sonda puente para la detección de un SNP o una mutación puntual.

La figura 11 ilustra un procedimiento para el enriquecimiento y/o la detección de un ácido nucleico diana mediante un cebador de enriquecimiento y cebadores de amplificación; el molde de ácido nucleico es capaz de formar una estructura de horquilla.

La figura 12 muestra cebadores de amplificación con una secuencia de cola en el lado 5'. (A) Molde de ácido nucleico capaz de formar una estructura de horquilla que se crea por la extensión de un primer cebador de amplificación con una secuencia de cola en el lado 5'. La secuencia de cola del lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica complementaria del sitio de unión del segundo cebador de amplificación. En otras palabras, la secuencia de cola de lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del segundo cebador. Los cebadores de amplificación primero y segundo son capaces de hibridar con el producto de extensión de los cebadores de amplificación segundo y primero, respectivamente. (B) Molde de ácido nucleico capaz de formar una estructura de horquilla que se crea por la extensión de un primero y un segundo cebador de amplificación con la misma secuencia de cola en el lado 5'. La secuencia de cola en el lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica complementaria del sitio de unión de un tercer cebador de amplificación. En otras palabras, la secuencia de cola en el lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del tercer cebador. El tercer cebador puede ser un cebador universal arbitrario sin relación con la secuencia diana. (C) Muestra una estructura similar a (B) pero con un segundo cebador de enriquecimiento adicional hibridado con la región de diagnóstico de la segunda hebra del ácido nucleico diana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0038] La presente invención se dirige a procedimientos y sondas sensibles y mejorados para la detección y el enriquecimiento de ácidos nucleicos deseados a partir de una población mixta de ácidos nucleicos para uso en ensayos para detectar y monitorizar la expresión génica o mutaciones raras en una muestra de prueba.

I. Materiales

45 A. Ácido nucleico diana en una muestra

[0039] Una muestra se refiere a cualquier sustancia que contiene o presumidamente contiene un ácido nucleico e incluye una muestra de tejido o fluido aislado de un individuo o individuos. Según se usa en este documento, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a cebadores, sondas, fragmentos oligoméricos por detectar, controles oligoméricos y oligómeros bloqueantes sin marcar y deberán ser genéricos para polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido de una base purina o pirimidina o de bases purina o pirimidina modificadas. No se pretende hacer distinción de longitud entre los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" y estos términos se usarán de manera intercambiable. Estos términos se refieren solamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, estos términos incluyen ADN bi- y monocatenario, así como ARN bi- y monocatenario. El oligonucleótido está compuesto de una secuencia de aproximadamente al menos seis nucleótidos, preferentemente al menos 10-12 nucleótidos y con mayor preferencia al menos 15-20 nucleótidos que corresponden a una región de la secuencia nucleotídica designada.

[0040] Según se usa en este documento, el término "secuencia diana" o "secuencia de ácido nucleico diana" se refiere a una región que ha ampliarse, detectarse o ambas cosas. La secuencia diana que es objeto de amplificación y detección puede ser cualquier ácido nucleico. La secuencia diana puede ser ARN, ADNc, ADN

genómico o ADN de un microorganismo o virus causante de enfermedades. La secuencia diana puede ser también ADN tratado con reactivos químicos, diversas enzimas y exposición física. Una secuencia de ácido nucleico diana de interés en una muestra puede presentarse como ADN o ARN monocatenarios, como ADNc, ARNm, otros ARN o como hebras complementarias separadas. La separación de las hebras complementarias de un ácido nucleico diana puede llevarse a cabo por medios físicos, químicos o enzimáticos.

5 B. Cebadores

[0041] El término “cebador”, según se usa en este documento, se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador, complementario de una hebra de un ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente para polimerización, como una ADN-polimerasa, y con una temperatura y condiciones de tamponamiento adecuadas. Preferentemente, el cebador es monocatenario para una máxima eficacia de amplificación, pero alternativamente puede ser bicatenario. El cebador debe tener una longitud suficiente para iniciar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, como la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento.

[0042] El término “complementario de” se usa en este documento en relación con nucleótidos para indicar un nucleótido que se apareará con otro nucleótido específico. Por lo tanto, trifosfato de adenosina es complementario de trifosfato de uridina o trifosfato de timidina y trifosfato de guanosina es complementario de trifosfato de citidina. Se aprecia que mientras el trifosfato de timidina y el trifosfato de guanosina pueden aparearse en ciertas circunstancias, no se consideran complementarios para los fines de esta memoria descriptiva. También se apreciará que mientras el trifosfato de citosina y el trifosfato de adenosina pueden aparearse en ciertas circunstancias, no se consideran complementarios para los fines de esta memoria descriptiva. Lo mismo se aplica al trifosfato de citosina y el trifosfato de uracilo.

[0043] Los cebadores en este documento se seleccionan para ser “sustancialmente” complementarios de las diferentes hebras de cada secuencia específica que ha de amplificarse. Esto significa que los cebadores han de ser suficientemente complementarios para hibridar con sus hebras respectivas. Por lo tanto, la secuencia del cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, cuando el cebador de enriquecimiento comprende una secuencia nucleotídica en la que el nucleótido 3'-terminal es complementario del supuesto nucleótido variante o del correspondiente nucleótido normal, puede unirse un fragmento nucleotídico no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementaria de la porción de diagnóstico de la secuencia de bases diana. Sin embargo, normalmente los cebadores tienen una complementariedad exacta, excepto en la medida en que pueda haber presentes nucleótidos no complementarios en un extremo predeterminado del cebador según se ha descrito anteriormente en este documento.

[0044] Sin embargo, se apreciará que en ciertas circunstancias, la síntesis de un producto de extensión de un cebador puede inducirse incluso en presencia de un resto 3'-terminal no complementario. Este resultado de tipo artefacto puede presentarse a partir de una temperatura de hibridación/incubación demasiado baja (en cuyo caso, la temperatura puede aumentarse), un tiempo de incubación/hibridación demasiado largo (en cuyo caso, el tiempo puede reducirse), una concentración de sal demasiado alta (en cuyo caso, la concentración de sal puede reducirse), una concentración de enzima o de trifosfatos de nucleósidos demasiado alta, un pH incorrecto o una longitud incorrecta del cebador oligonucleotídico. Los resultados de tipo artefacto pueden evitarse mediante la introducción deliberada de uno o más restos de apareamiento incorrecto adicionales, o si se desea, de supresiones o inserciones en el cebador de diagnóstico, para desestabilizar el cebador al reducir aún más la unión durante la hibridación.

[0045] El término “cebador de enriquecimiento” se usa en este documento para referirse al cebador que tiene una secuencia nucleotídica tal que es sustancialmente complementaria de una región de diagnóstico en la que se localiza el supuesto nucleótido variante. Cuando un cebador de enriquecimiento hibrida con una secuencia diana, puede extenderse o puede no extenderse dependiendo de la presencia o ausencia del supuesto nucleótido variante. En una realización, cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante, el cebador de enriquecimiento hibridado puede no ser extensible, con lo que el cebador de enriquecimiento se disocia de la secuencia diana en las condiciones de extensión y permite así que la extensión del cebador de amplificación pase a través de la región que contiene el supuesto nucleótido variante. Cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal, el cebador de enriquecimiento hibridado se extiende para sintetizar el producto de extensión del cebador de enriquecimiento, con lo que la extensión a partir de un cebador de amplificación anterior se bloquea por dicho producto de extensión del cebador de enriquecimiento. En otra realización, el molde de ácido nucleico forma una estructura de horquilla en las condiciones de hibridación. La porción bicatenaria de la horquilla comprende el sitio de unión del cebador de amplificación; el bucle de la horquilla comprende la secuencia de ácido nucleico diana. El cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico

en el bucle. El cebador de enriquecimiento se extiende cuando hibrida con la región de diagnóstico con un nucleótido variante, esta extensión abre la estructura de horquilla y de este modo permite al cebador de amplificación hibridar con el sitio de unión del cebador en las condiciones de hibridación y promover la amplificación. El cebador de amplificación puede no ser extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico con un nucleótido normal, con lo que la estructura de horquilla se mantiene intacta y es capaz de impedir que un cebador de amplificación hibride con el sitio de unión de dicho cebador.

[0046] Se prefiere que un nucleótido terminal del cebador de enriquecimiento se seleccione para ser complementario del supuesto nucleótido variante o del correspondiente nucleótido normal, de modo que se sintetice un producto de extensión del cebador de enriquecimiento cuando el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico que contiene un nucleótido concreto, pero no se sintetice un producto de extensión tal cuando el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico que no contiene un nucleótido concreto de la secuencia de ácido nucleico diana.

[0047] El término "región de diagnóstico", según se usa en este documento, indica aquella región de la secuencia de ácido nucleico diana que contiene el potencial nucleótido variante como nucleótido terminal o nucleótido interno, cuya presencia o ausencia ha de detectarse. Deberá apreciarse que el uso de los términos "nucleótido variante" "nucleótido normal" o "nucleótido mutante" depende de la situación y puede ser intercambiable. En una situación, un nucleótido puede denominarse variante o mutante, pero en otra situación puede denominarse nucleótido normal.

[0048] El cebador de enriquecimiento puede comprender una fracción que hace que el producto de extensión del cebador de enriquecimiento no sea adecuado para una amplificación exponencial. En una realización, la fracción puede ser una fracción bloqueante (o denominada fracción que no puede copiarse), en que la replicación de todo o parte de dicho cebador de enriquecimiento se encuentra bloqueada, con lo que la molécula de extensión del cebador generada a partir de un molde de la hebra de extensión del cebador de enriquecimiento no es adecuada como molde para una extensión posterior del cebador ya que carece de un sitio de unión del cebador. La fracción bloqueante puede ser un brazo de hidrocarburo, un HEG, un enlace no nucleotídico, ribosa abásica, derivados de nucleótidos o un colorante. La fracción bloqueante puede estar situada a menos de 18 nucleótidos de distancia del extremo 3' del cebador de enriquecimiento. Se prefiere que la fracción bloqueante esté situada a menos de seis nucleótidos de distancia del extremo 3' del cebador de enriquecimiento. Se prefiere más que la fracción bloqueante esté situada a menos de tres nucleótidos de distancia del extremo 3' del cebador de enriquecimiento.

[0049] El cebador para uso en los procedimientos desvelados en la presente invención comprende una secuencia en el lado 3' complementaria de una secuencia diana que se usa normalmente para iniciar una reacción de extensión. Esta parte del cebador se denomina la porción iniciadora del lado 3' del cebador de enriquecimiento. En otra realización, el cebador de enriquecimiento puede comprender secuencias adicionales en el lado 5' de la porción iniciadora del cebador de enriquecimiento que pueden ser complementarias o no de una secuencia diana; esta secuencia adicional se denomina cola. En una realización, el cebador de enriquecimiento comprende una secuencia de cola en el lado 5' que es complementaria o sustancialmente complementaria de un sitio de unión de un cebador en el producto de extensión del cebador de enriquecimiento. El producto de extensión del cebador de enriquecimiento, sometido a condiciones de desnaturalización e hibridación, se repliega para formar una estructura de horquilla que impide una unión posterior del cebador.

[0050] El cebador de enriquecimiento puede ser un cebador oligonucleotídico ordinario, a base de nucleótidos naturales y un enlace fosfodiéster; en otras palabras, puede que no comprenda ningún grupo no nucleotídico, ninguna fracción química de enlace o nucleótidos modificados. En esta realización, una parte o todo el cebador de enriquecimiento es degradable por una actividad nucleasa. Cuando el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal en la secuencia diana, dicho cebador de enriquecimiento se extiende por una ADN-polimerasa con una actividad exonucleasa 5' en condiciones de extensión que comprenden al menos un trifosfato de desoxinucleósido modificado. Una parte o todo el cebador de enriquecimiento se degrada por dicha actividad exonucleasa 5', mientras que una parte o toda la hebra extendida es resistente al corte (figura 4).

[0051] En una realización, una variación nucleotídica dada, por ejemplo, una mutación puntual, se enriquece y se detecta mediante el diseño del cebador de enriquecimiento para que tenga un nucleótido terminal apropiado que sea complementario del nucleótido normal, de modo que la síntesis del producto de extensión del cebador de enriquecimiento bloquee la extensión de un cebador de amplificación anterior. Cuando el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico que contiene el nucleótido variante, el extremo 3' incorrectamente apareado del cebador de enriquecimiento no puede extenderse y dicho cebador de enriquecimiento se disociará del molde en las condiciones de extensión. A este respecto, al referirse en este documento al "nucleótido terminal apropiado", se indica el nucleótido terminal del cebador a partir del cual, en uso, se iniciará la

síntesis si es posible. Por lo tanto, dado que en general el agente para la polimerización iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador, el nucleótido terminal apropiado será en general en nucleótido 3'-terminal. Para impedir que el nucleótido 3'-terminal u otros nucleótidos del cebador de enriquecimiento sean digeridos por una actividad nucleasa, el cebador de enriquecimiento puede comprender nucleótidos o enlaces modificados que hacen que todo o parte del cebador de enriquecimiento sea resistente al corte con nucleasas. Se prefiere que los últimos cinco nucleótidos o enlaces en el extremo 3' y/o el extremo 5' estén modificados, de modo que el cebador de enriquecimiento sea resistente al corte con nucleasas. Se prefiere más que el último nucleótido o enlace en el extremo 3' y/o el extremo 5' esté modificado, de modo que el cebador de enriquecimiento sea resistente al corte con nucleasas. Puede usarse cualquier tipo de modificación que haga al cebador resistente al corte con exonucleasas. Algunos ejemplos incluyen un enlace fosforotioato, un enlace metilfosfonato, ANB, APN, oligo-2'-OMe-nucleótidos o similares.

[0052] En otra realización, una variación nucleotídica dada se enriquece y detecta mediante el diseño del cebador de enriquecimiento para que tenga un nucleótido terminal apropiado que sea complementario del supuesto nucleótido variante. En este caso, el nucleótido 3'-terminal del cebador de enriquecimiento se modifica de modo que no sea adecuado para una extensión con polimerasa, con lo que el cebador de enriquecimiento que hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante no puede extenderse. Cuando el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal, el nucleótido 3'-terminal incorrectamente apareado del cebador de enriquecimiento es eliminado por la actividad correctora de una polimerasa de ácido nucleico, lo que hace que el cebador de enriquecimiento pueda extenderse. En otra realización más, el cebador de enriquecimiento tiene un nucleótido 3'-terminal bloqueado que es complementario del nucleótido normal en la región de diagnóstico. El nucleótido 3'-terminal bloqueado es eliminado por la actividad de pirofosforilisis de una enzima, preferentemente una ADN-polimerasa, cuando se aparea correctamente con el nucleótido normal en el molde. El bloqueo del extremo 3' del cebador de enriquecimiento puede conseguirse de cualquier manera conocida en la técnica. Las fracciones bloqueantes son fracciones químicas que pueden añadirse a un ácido nucleico para inhibir la polimerización del ácido nucleico catalizada por una polimerasa de ácido nucleico. Típicamente las fracciones bloqueantes se localizan en el extremo 3'-terminal del cebador de enriquecimiento, que consta de nucleótidos y derivados de estos. Por ejemplo, al unir un grupo bloqueante a un terminal 3'-OH, el grupo 3'-OH deja de estar disponible para aceptar un trifosfato de nucleósido en una reacción de polimerización. Es posible añadir numerosos grupos diferentes para bloquear el extremo 3' del cebador de enriquecimiento. Algunos ejemplos de tales grupos incluyen grupos alquilo, enlazantes no nucleotídicos, fosforotioatos, restos alcanodiol, ácidos péptidonucleicos y derivados nucleotídicos que carecen de un 3'-OH (por ejemplo, cordicepina, didesoxinucleótidos o acyclonucleótidos).

[0053] El término "primer cebador de amplificación" se usa en este documento para referirse a un cebador que es capaz de hibridar con la secuencia diana anterior al cebador de enriquecimiento y se usa para la amplificación. Cuando se usan un primero y un segundo "cebadores de amplificación" en una reacción, el par de cebadores de amplificación amplifica una región diana que abarca la región de diagnóstico. Un "cebador de amplificación" tiene una secuencia nucleotídica tal que es capaz de hibridar con un producto de extensión del otro cebador de amplificación después de la separación de su complemento, con lo que un producto de extensión de un cebador sirve de molde para la síntesis de un producto de extensión de otro cebador de amplificación. Cuando dos oligonucleótidos diferentes no solapantes hibridan con regiones diferentes de la misma secuencia de ácido nucleico complementaria lineal y el extremo 3' de un oligonucleótido apunta hacia el extremo 5' del otro, el primero puede denominarse el oligonucleótido "anterior" y el segundo el oligonucleótido "posterior".

[0054] En algunas realizaciones, puede crearse un molde de ácido nucleico capaz de formar una estructura de horquilla por la extensión de un primer cebador de amplificación con una secuencia de cola en el lado 5'. La secuencia de cola en el lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica complementaria del sitio de unión del segundo cebador de amplificación. En otras palabras, la secuencia de cola en el lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del segundo cebador. Los cebadores de amplificación primero y segundo son capaces de hibridar con el producto de extensión de los cebadores segundo y primero, respectivamente. Alternativamente, el molde de ácido nucleico capaz de formar una estructura de horquilla puede crearse por la extensión de un primero y un segundo cebadores de amplificación con la misma secuencia de cola en el lado 5'. La secuencia de cola en el lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica complementaria del sitio de unión de un tercer cebador de amplificación. En otras palabras, la secuencia de cola en el lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del tercer cebador. El tercer cebador puede ser un cebador universal arbitrario sin relación con la secuencia diana.

[0055] El cebador de enriquecimiento o el cebador de amplificación pueden ser oligonucleótidos marcados. El término "marcador", según se usa en este documento, se refiere a cualquier átomo o molécula que puede usarse para proporcionar una señal detectable (preferentemente cuantificable) y que puede unirse a un ácido nucleico o

proteína. Los marcadores pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, magnetismo, actividad enzimática y similares.

[0056] En una realización, la presente invención se dirige al enriquecimiento de más de un supuesto nucleótido variante en la misma muestra. En este caso, es posible incluir en una reacción más de un cebador de enriquecimiento que se dirijan específicamente a SNP o mutaciones diferentes.

B. Sondas

[0057] Según se usa en este documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido marcado que forma una estructura de dúplex con una secuencia en el ácido nucleico molde debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en la región del molde. Normalmente, la sonda no contiene ninguna secuencia complementaria de la(s) secuencia(s) usada(s) para iniciar la amplificación. Pero en algunas realizaciones de la presente invención, una sonda sí contiene una secuencia complementaria de una parte de un cebador. Generalmente, el extremo 3' de la sonda se "bloquea" para impedir la incorporación de la sonda en un producto de extensión de un cebador. Pero en algunas realizaciones de la presente invención, algunas sondas también funcionan como cebadores y, por lo tanto, no se bloquean en el extremo 3'. El "bloqueo" puede llevarse a cabo mediante bases no complementarias o por la adición de una fracción química como biotina o un grupo fosfato al hidroxilo 3' del último nucleótido, los cuales, dependiendo de la fracción seleccionada, pueden tener una finalidad doble al actuar también como marcadores para una detección posterior o la captura del ácido nucleico unido al marcador. El bloqueo también puede llevarse a cabo por eliminación del 3'-OH o el uso de un nucleótido que carece de un 3'-OH como un didesoxinucleótido.

[0058] Diversas sondas pueden usarse conjuntamente con la presente invención. Se prefiere que la sonda usada sea una sonda puente. Una sonda puente comprende al menos dos porciones de unión enlazadas por una porción de puente, en que la primera porción de unión es capaz de hibridar con una primera región de un ácido nucleico molde y en que la segunda porción de unión es capaz de hibridar con una segunda región adyacente o sustancialmente adyacente a la primera región del ácido nucleico molde.

[0059] El término "adyacente" o "sustancialmente adyacente", según se usa en este documento, se refiere a la localización de la segunda porción de unión con respecto a la primera porción de unión en la hebra complementaria de las mismas del ácido nucleico molde. Las dos regiones del molde que hibridan con las porciones de unión primera y segunda de una sonda puente pueden ser contiguas, es decir, no existe separación entre las dos regiones del molde. Alternativamente, las dos regiones del molde que hibridan con las porciones de unión primera y segunda de una sonda puente pueden estar separadas por uno a aproximadamente 200 nucleótidos, con mayor preferencia, de aproximadamente uno a 100 nucleótidos. Alternativamente, cuando el presente procedimiento se usa en los procedimientos de enriquecimiento por PCR y detección según se exponen en este documento, la "adyacencia" puede corresponder a cualquier punto dentro de la secuencia que ha de amplificarse o a cualquier punto posterior a un cebador de amplificación.

[0060] La primera región de un ácido nucleico molde puede ser una región de interés en un ácido nucleico diana, que puede ser una región de diagnóstico con supuestos nucleótidos variantes (figura 6A, B, C, D). Alternativamente, la primera región de un ácido nucleico molde puede ser una región en un producto de extensión de un cebador, en que la segunda región es una parte de un cebador o una sonda (figura 6G, H). En otro aspecto, la primera región de un ácido nucleico molde y la segunda región de un ácido nucleico molde pueden ser las dos partes de un cebador o una sonda (figura 6I).

[0061] La porción de puente se localiza en la sonda entre las porciones de unión. La porción de puente puede comprender una fracción química nucleotídica o no nucleotídica y puede ser de cualquier longitud. Sin embargo, para una distancia de espaciamiento dada entre la primera región y la segunda región del ácido nucleico molde, la longitud y/o composición de la porción de puente son capaces de regular la Tm de la porción de unión individual y/o la Tm de la sonda puente como molécula enlazada. Por definición, la temperatura de fusión (Tm) es la temperatura a la que la mitad del dúplex de ADN se disocia para hacerse monocatenario e indica la estabilidad del dúplex. Es ventajoso que la porción de puente incluya algunas fracciones químicas no nucleotídicas que no sean adecuadas como moldes para la ADN-polimerasa, lo que reduce la iniciación inespecífica. Además, algunas fracciones químicas pueden ser más flexibles, es decir pueden no ser tan rígidas como los enlaces nucleotídicos naturales y, por lo tanto, son fáciles de plegar y pueden aumentar la Tm real para la porción de unión de baja Tm. Tales fracciones no nucleotídicas pueden incluir, pero no se limitan a HEG, enlaces no nucleotídicos, derivados o análogos de nucleótidos o un colorante. La porción de puente no solo enlaza dos porciones de unión, sino que regula las características de unión de la sonda puente, especialmente la porción de unión de la sonda puente con un baja Tm individual. Normalmente, las dos porciones de unión se consideran moléculas separadas, ya que una porción de unión tiene una Tm mayor que la otra porción de unión. La longitud de la porción de unión afectará a la temperatura

a la que la porción de unión, especialmente la porción con la Tm más baja, hibrida con el molde o se disocia de este. Dependiendo de la distancia entre las dos regiones del ácido nucleico molde hibridado con las dos porciones de unión de una sonda puente, generalmente la sonda puente como una molécula enlazada, así como la porción de unión considerada individualmente tienen una Tm mayor cuando la longitud de la porción de puente está próxima a la distancia entre las dos regiones de molde hibridadas con las dos porciones de unión de una sonda puente. Esta regla puede aplicarse solamente cuando la distancia entre las dos regiones de molde hibridadas con las dos porciones de unión de una sonda puente no es demasiado grande y no puede ser mayor de 200 nucleótidos. Para este fin, la longitud de la porción de unión puede estar en el intervalo de ninguno a 200 nucleótidos o equivalente, con mayor preferencia de aproximadamente uno a 100 nucleótidos o equivalente.

[0062] Las porciones de unión unidas a los extremos de la porción de puente están diseñadas para formar un híbrido específico y estable con una secuencia específica de un ácido nucleico molde. La porción de unión puede ser de cualquier longitud deseada, generalmente se prefiere una longitud de dos a 60 nucleótidos y lo más preferido es una longitud de seis a 40 nucleótidos. La porción de unión puede comprender nucleótidos, derivados de nucleótidos, análogos o fracciones químicas no nucleotídicas.

[0063] Las porciones de unión pueden ser complementarias de una secuencia de ácido nucleico diana específica y pueden estar diseñadas para ser específicas de una variante concreta en un locus. Se prefiere que al menos una porción de unión (la primera porción de unión) sea complementaria de una región de diagnóstico en la que se localiza un supuesto nucleótido variante. También es deseable que dos o más porciones de unión sean complementarias de múltiples regiones de diagnóstico, cada una de las cuales comprende un nucleótido variante.

[0064] En la práctica del procedimiento, las diferentes porciones de unión de una sonda puente pueden hibridar con un ácido nucleico complementario de manera simultánea. Alternativamente, cada porción de unión puede estar diseñada para tener distintas propiedades, especialmente cuando hibrida con un ácido nucleico diana apareado correcta o incorrectamente. Para entender mejor el concepto de esta invención, se asignan dos temperaturas de fusión (Tm) a cada porción de unión: Tm-s es la temperatura de fusión cuando se considera cada porción de unión como un oligonucleótido separado; Tm-p es la temperatura de fusión real cuando las porciones de unión en una sonda puente se consideran como una molécula enlazada, es decir, en una situación real la porción de unión hibrida con un ácido nucleico diana correctamente apareado a la temperatura Tm-p. Para una secuencia dada de una porción de unión, su Tm-s es constante y no cambia, mientras que su Tm-p depende en parte de la longitud y/o la composición de la porción de puente. Con una porción de puente apropiada, la Tm-p de una porción de unión es normalmente mayor que su Tm-s. Esto puede ser muy útil para detectar mutaciones puntuales o diferencias de un solo nucleótido.

[0065] En una realización, mientras que la primera porción de unión hibrida con una región de diagnóstico con un supuesto nucleótido variante, la segunda porción de unión hibrida con una región cercana con respecto a la región de diagnóstico. Se diseña que la Tm-s de la segunda porción de unión sea mayor que la Tm-s de la primera porción de unión. El saber para diseñar oligonucleótidos con diferentes Tm es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, un oligonucleótido de mayor longitud con un alto contenido de G/C puede tener una alta Tm. Dado que la segunda porción de unión tiene una alta Tm-s, hibridará primero con el ácido nucleico diana y a una alta temperatura de hibridación. Debido al enlace de la primera porción de unión con la segunda porción de unión por una porción de puente apropiada, la Tm-p de la primera porción de unión es mayor que su Tm-s. Por ejemplo, si una segunda porción de unión de una sonda puente tiene una Tm-s de 65°C, la primera porción de unión de la sonda puente tiene una baja Tm-s de 36°C. En realidad, la Tm-p de la primera porción de unión puede ser de 55°C. Normalmente, como la primera porción de unión tiene una baja Tm-s, puede ser de poca longitud. Es ventajoso diseñar la primera porción de unión para que sea de poca longitud, lo que resulta en una baja Tm-s, pero la Tm-p será alta. A diferencia de otros diseños de sondas en los que la sonda puede tener una Tm apropiada alta pero puede perder o tener una capacidad limitada para distinguir una diferencia de un solo nucleótido, el presente diseño tiene gran capacidad para distinguir entre diferencias de un solo nucleótido. La primera porción de unión hibrida con regiones de diagnóstico correcta e incorrectamente apareadas a Tm-p muy diferentes, lo que puede observarse fácilmente. Siguiendo el ejemplo anterior, la primera porción puede hibridar con una región de diagnóstico correctamente apareada a 55°C, mientras que puede hibridar con una región de diagnóstico incorrectamente apareada a 50°C, diferencias de temperatura que son fácilmente distinguibles.

[0066] Las modificaciones de la sonda que pueden facilitar la unión de dicha sonda incluyen, pero no se limitan a la incorporación de enlaces fosfodiéster de carga positiva o neutra en la sonda para disminuir la repulsión de los armazones polianiónicos de la sonda y la diana (véase Letsinger y col., 1988, J. Amer. Chem. Soc. 110: 4470); la incorporación de bases alquiladas o halogenadas como 5-bromouridina en la sonda para aumentar el apilamiento de las bases; la incorporación de ribonucleótidos en la sonda para forzar el dúplex formado por la sonda y la diana a adoptar una estructura en "A", que tiene un mayor apilamiento de las bases; y la sustitución de algunas o todas las adenosinas en la sonda por 2,6-diaminopurina (aminoadenosina); la incorporación de derivados

nucleotídicos como ANB (ácido nucleico bloqueado), APN (ácido peptidonucleico) o similares.

[0067] Las dos porciones de unión enlazadas por la porción de puente pueden existir en diversas orientaciones. Un extremo de la porción de puente puede estar unido al extremo 5' de la primera porción de unión y el otro extremo de la porción de puente puede estar unido al extremo 3' de la segunda porción de unión (figura 6A, C y D). En otra realización, un extremo de la porción de puente puede estar unido al extremo 5' de la primera porción de unión y el otro extremo de la porción de puente puede estar unido al extremo 3' de la segunda porción de unión. Alternativamente, un extremo de la porción de puente puede estar unido al extremo 3' de la primera porción de unión y el otro extremo de la porción de puente puede estar unido al extremo 5' de la segunda porción de unión (figura 6B).

[0068] Las porciones de unión de la sonda de puente pueden hibridar con un ácido nucleico molde de modos diferentes tales que los extremos de las porciones de unión pueden apuntar en direcciones diferentes. En una realización, los extremos de una sonda puente apuntan el uno al otro cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico molde. Esta forma de hibridación puede poner muy próximos los dos extremos de la sonda puente (figura 6A). En otra realización, los extremos de una sonda puente apuntan en direcciones opuestas entre sí cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico molde (figura 6C y D). En una realización más, los extremos de una sonda puente apuntan en la misma dirección cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico molde (figura 6B).

[0069] En una realización, la segunda porción de unión de una sonda puente es complementaria de una parte de un cebador, mientras que la primera porción de unión es complementaria de una parte de una secuencia en la hebra de extensión del cebador. El extremo 3' de la segunda porción de unión y una posición apropiada del cebador están marcados con un par marcador interactivo, de modo que, al hibridar la sonda puente con la hebra de extensión del cebador, las dos hebras quedan en una relación FRET o de desactivación por contacto (figura 6G, H). El marcador en el cebador puede localizarse en cualquier posición, siempre que interaccione con el marcador en la sonda puente. En otra realización, la segunda porción de unión de una sonda puente es complementaria con la parte 5' del cebador / la segunda sonda, mientras que la primera porción de unión es complementaria de la parte 3' del cebador / la segunda sonda. El extremo 3' de la segunda porción de unión y el extremo 5' del cebador / la segunda sonda están marcados con un par marcador interactivo (figura 6I). En esta realización, cuando el cebador o la segunda sonda hibridan con un ácido nucleico diana, la sonda puente se disocia total o parcialmente del cebador o de la segunda sonda, lo que genera señales detectables. En esta realización se prefiere que las regiones de molde del cebador o la segunda sonda hibridadas con las porciones de unión de la sonda puente sean secuencias arbitrarias y pueden diseñarse para ser constantes entre diferentes cebadores y sondas. Por lo tanto, la sonda puente que se une a los cebadores o las segundas sondas puede ser una sonda universal que puede ser común a un conjunto de cebadores o segundas sondas.

[0070] En otra realización, se proporciona un conjunto de sondas puente para la exploración de mutaciones desconocidas. Se diseñan múltiples sondas puente para cubrir toda la región de interés en una secuencia de ácido nucleico diana. Cada una de las sondas puente puede estar marcada con colorantes diferentes. Las propiedades de fusión de la sonda puente que hibrida con el ácido nucleico diana se comparan con las propiedades de fusión de las sondas puente hibridadas con una diana normal y una diana que supuestamente contiene mutaciones (figura 8).

[0071] Se prefiere que una sonda puente comprenda marcadores de detección. Los marcadores producen señales detectables durante la hibridación de la sonda con un ácido nucleico diana o durante la disociación de la sonda de un ácido nucleico diana. Una sonda puente puede comprender un solo marcador; alternativamente, una sonda puente puede comprender un primer marcador y un segundo marcador (figura 6A, B, C). Una sonda puente y su cebador o sonda interactivos puede comprender un primer marcador y un segundo marcador, respectivamente (figura 6E, F, G, H, I).

[0072] En una realización, la primera porción de unión está unida a un primer marcador, la segunda porción de unión está unida a un segundo marcador, en que dicho primer marcador y dicho segundo marcador son pares de desactivación por contacto, en que uno de los marcadores es un desactivador, en que, al hibridar las sondas con la secuencia diana, los marcadores primero y segundo quedan en una relación de desactivación por contacto.

[0073] En otra realización, la primera porción de unión está unida a un primer marcador, la segunda porción de unión está unida a un segundo marcador, en que dicho primer marcador y dicho segundo marcador son pares de transferencia de energía de fluorescencia, en que, al hibridar las sondas con la secuencia diana, los marcadores primero y segundo quedan en una relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

[0074] En otra realización más, una sonda puente pueden necesitar trabajar conjuntamente con otra sonda o cebador oligonucleotídicos, según se representa en las figuras 6E, 6G, 6H y 6I. En la figura 6E, una sonda puente y otra sonda hibridan con regiones adyacentes de la secuencia diana, en que una de las sondas está marcada con un

fluoróforo y la otra sonda está marcada con un desactivador de un par FRET o de desactivación por contacto, de modo que, al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto, en que el fluoróforo y el desactivador están a una distancia máxima de cinco nucleótidos entre sí. En las figuras 6G y 6H, una reacción de amplificación contiene cebadores de amplificación y una sonda puente, en que uno de dichos cebadores de amplificación y la sonda están marcados, respectivamente, con un miembro de un par formado por un fluoróforo y un desactivador, de modo que, al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto, en que la sonda marcada hibrida con una copia amplificada de la secuencia de ácido nucleico diana a una distancia máxima de cinco nucleótidos del cebador marcado o la sonda marcada hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y una parte del cebador marcado.

[0075] Es sabido que en ensayos de hibridación homogénea, dos fluoróforos interactivos pueden unirse a los extremos de dos sondas oligodesoxirribonucleotídicas diferentes o a los dos extremos de la misma sonda oligodesoxirribonucleotídica. Un ácido nucleico diana se manifiesta al poner el fluoróforo donador y el fluoróforo acceptor próximos entre sí, lo que permite que tenga lugar una transferencia de energía entre ambos, o al separarlos entre sí, lo que impide la transferencia de energía (Marras SAE y col., 2002, Nucleic Acids Res. 30(21)). Los primeros formatos para ensayos de hibridación homogénea utilizaban un par de sondas oligodesoxirribonucleotídicas marcadas en sus respectivos extremos 5' y 3' y diseñadas para unirse a sitios adyacentes en una hebra diana y poner así una fracción donadora y una fracción aceptora próximas entre sí (patente n° EPO070685 y Cardullo RA y col., 1988). Una segunda estrategia utiliza un par de oligodesoxirribonucleotídicos mutuamente complementarios, en que uno de los oligodesoxirribonucleotídicos sirve como sonda para una secuencia diana monocatenaria. El extremo 5' de un oligodesoxirribonucleotídeo está marcado con un fluoróforo donador y el extremo 3' del otro oligodesoxirribonucleotídeo está marcado con un fluoróforo acceptor, de modo que cuando los dos oligodesoxirribonucleotídicos hibridan entre sí, los dos marcadores quedan próximos entre sí. Dado que los oligodesoxirribonucleotídicos complementarios de pequeño tamaño se unen entre sí en un equilibrio dinámico, las hebras diana compiten por la unión con la sonda, lo que causa la separación de los oligodesoxirribonucleotídicos marcados (Morrison LE y col., 1989, Anal. Biochem. 183: 231-244). En una tercera estrategia, los fluoróforos donador y acceptor están unidos a los extremos del mismo oligodesoxirribonucleotídeo, que sirve de sonda. Dado que un oligodesoxirribonucleotídeo en disolución se comporta como un arrollamiento al azar, ocasionalmente sus extremos se encuentran próximos entre sí, lo que resulta en un cambio medible de la transferencia de energía. Sin embargo, cuando la sonda se une a su diana, la rigidez de la hélice formada por la sonda y la diana mantiene los dos extremos de la sonda separados entre sí, lo que impide la interacción entre las fracciones donadora y aceptora (Parkhurst KM y Parkhurst LJ, 1995, Biochemistry 34: 285-292). En la cuarta estrategia, los oligodesoxirribonucleotídicos monocatenarios denominados balizas tienen secuencias adicionales de poca longitud en cada uno de los extremos de una secuencia de una sonda que son complementarias entre sí, lo que permite que los marcadores terminales estén muy próximos a través de la formación de una horquilla. La unión de esta sonda a su diana crea un híbrido entre sonda y diana relativamente rígido que causa la disrupción de la horquilla y el alejamiento de la fracción donadora de la fracción aceptora y restablece la fluorescencia del donador (Tyagi S y Kramer FR, 1996, Nat. Biotechnol. 14: 303-308). Además de estos esquemas basados en hibridación y sus variaciones, es posible cortar enzimáticamente mediante la actividad endonucleasa 5'→3' de la ADN-polimerasa sondas marcadas dualmente y arrolladas al azar que se unen a las hebras del molde durante la reacción de PCR (sondas "TaqMan"TM) y separar así las fracciones donadora y aceptora, lo que permite monitorizar la síntesis del ácido nucleico en tiempo real (Heid CA, Stevens J, Livak KJ y Williams PM, 1996, Genome Res. 6: 986-994).

[0076] Si un fluoróforo acceptor se aproxima a un fluoróforo donador, en el intervalo de 20-100 Å, la intensidad de fluorescencia del fluoróforo acceptor aumenta, mientras que la intensidad de fluorescencia del fluoróforo donador disminuye. Esto es debido a un aumento de la eficacia de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) del fluoróforo donador al acceptor. Sin embargo, si las dos fracciones se aproximan aún más, las intensidades de fluorescencia de ambos fluoróforos, donador y acceptor, se reducen. A estas distancias tan próximas, la mayor parte de la energía absorbida se disipa como calor y solo una pequeña cantidad de la energía se emite como luz, un fenómeno que a veces se denomina desactivación estática o por contacto (Lakowicz JR, 1999, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY, EE. UU.).

[0077] En sondas adyacentes y en sondas arrolladas al azar, las fracciones donadora y aceptora permanecen a una distancia entre sí tal que el mecanismo predominante de desactivación es FRET. Por otro lado, cuando las sondas de hibridación competitiva y las balizas moleculares no están hibridadas con las dianas, las dos fracciones están muy próximas entre sí y el mecanismo predominante de desactivación es la desactivación por contacto. Una de las características útiles de la desactivación por contacto es que todos los fluoróforos se desactivan de manera similar, con independencia de si el espectro de emisión del fluoróforo solapa con el espectro de absorción del desactivador, una de las condiciones clave que determina la eficiencia de FRET (Tyagi S, Bratu DP y Kramer FR, 1988, Nat. Biotechnol. 16: 49-53).

[0078] Otra simplificación de los ensayos homogéneos que usan sondas marcadas por fluorescencia es el uso de colorantes no fluorescentes como aceptores o desactivadores. La desactivación por colorantes no fluorescentes permite medir los cambios en la intensidad de fluorescencia directamente, más que como una alteración de la forma del espectro de emisión, que es más difícil de monitorizar. Esta mejora ha conducido también a un mayor grado de

5 multiplicidad, ya que la parte del espectro que habría estado ocupada por la fluorescencia del desactivador puede reservarse en su lugar para la fluorescencia de fluoróforos adicionales para la detección de más dianas (Marras SA, Kramer FR y Tyagi S, 1999, Genet. Anal. 14: 151-156).

[0079] Recientemente, se ha presentado una serie de desactivadores no fluorescentes únicos, desde 10 nucleótidos hasta partículas de oro, para uso en sondas fluorogénicas. (Dubertret B, Calame M y Libchaber AJ, 2001, Nat. Biotechnol. 19: 363-370). Para estos desactivadores se han descrito eficacias de desactivación de hasta varios miles de veces.

[0080] En la técnica anterior discutida anteriormente, los investigadores han usado fundamentalmente 15 estrategias dependientes de la detección de un aumento de la fluorescencia de los marcadores al hibridar la sonda con la secuencia diana. FRET es el principal mecanismo detrás de estas estrategias. Las sondas de hibridación (patente de los EE. UU. n.º 6.174.670) usan dos colorantes fluorescentes que son dependientes del efecto FRET. Esta estrategia limita el número de múltiples dianas que pueden detectarse en una sola reacción.

[0081] En la presente descripción, el inventor ha encontrado que la detección de la disminución de la 20 fluorescencia de los marcadores debida a la desactivación por contacto al hibridar la sonda con la secuencia diana es más sensible que FRET. En una realización, una reacción de amplificación contiene cebadores de amplificación y una sonda de ácido nucleico, en que uno de dichos cebadores de amplificación y la sonda están marcados respectivamente con un miembro de un par formado por un fluoróforo y un desactivador, de modo que, al hibridar las 25 sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto. Una de las sondas de ácido nucleico puede ser una sonda puente.

[0082] En otra realización, en que una reacción de amplificación contiene cebadores de amplificación y dos 30 sondas de ácido nucleico que hibridan con regiones adyacentes de la secuencia diana, una de dichas sondas está marcada con un fluoróforo y la otra sonda está marcada con un desactivador de un par de desactivación por contacto, de modo que, al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto, en que el fluoróforo y el desactivador están a una distancia máxima de cinco nucleótidos entre sí. Una de las sondas de ácido nucleico puede ser una sonda puente.

[0083] Para una desactivación por contacto eficaz, se prefiere que los fluoróforos y el desactivador estén a 35 una distancia de aproximadamente 0-10 nucleótidos. Se prefiere más que los fluoróforos y el desactivador estén a una distancia de aproximadamente 0-5 nucleótidos. Lo más preferido es que los fluoróforos y el desactivador estén a una distancia de aproximadamente 0-2 nucleótidos. Preferentemente, el desactivador no es una entidad fluorescente. El desactivador puede ser una nanopartícula. Una nanopartícula puede ser una nanopartícula de oro. 40 También es posible que el desactivador sea un resto G o múltiples restos G.

[0084] En las realizaciones anteriores, los marcadores pueden ser fluoróforos interactivos o colorantes no 45 fluorescentes o cualquier entidad. Un ejemplo de tales marcadores interactivos es un par fluoróforo-desactivador. Un "fluoróforo", según se usa en este documento, se refiere a fracciones que absorben energía luminosa a una longitud de onda de excitación definida y emiten energía luminosa a una longitud de onda definida diferente. Algunos ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen, pero no se limita a: colorantes Alexa Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660 y Alexa Fluor 680), AMCA, AMCA-S, colorantes BODIPY (BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, 50 BODIPY 650/665), carboxirrodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), Cascade Blue, Cascade Yellow, colorantes de cianina (Cy3, Cy5, Cy3.5, Cy5.5), dansilo, dapoxilo, dialquilaminocumarina, 4',5'-dcloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, DM-NERF, eosina, eritrosina, fluoresceína, FAM, hidroxicumarina, colorantes IRD (IRD 40, IRD 700, IRD 800), JOE, lisamina-rodamina B, Marina Blue, metoxicumarina, naftofluoresceína, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, PyMPO, pireno, rodamina 6G, verde de rodamina, rojo de rodamina, Rhodol Green, 55 2',4',5',7'-tetrabromosulfonafluoresceína, tetrametilrodamina (TMR), carboxitetrametilrodamina (TAMRA), Texas Red y Texas Red-X.

[0085] Según se usa en este documento, el término "desactivador" incluye cualquier fracción que es capaz de 60 absorber la energía de un marcador fluorescente excitado cuando se localiza muy próxima al marcador fluorescente y es capaz de disipar esta energía. Un desactivador puede ser un desactivador fluorescente o un desactivador no fluorescente, que también se denomina desactivador oscuro. Los fluoróforos de la lista anterior pueden desempeñar un papel desactivador si se ponen en proximidad de otro fluoróforo, en cuyo caso puede tener lugar desactivación

por FRET o desactivación por contacto. Se prefiere el uso de un fluoróforo oscuro, que no emite ninguna luz visible. Algunos ejemplos de desactivadores oscuros incluyen, pero no se limitan a éster succinimidílico de DABCYL (ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico), ácido diarilrodaminocarboxílico, éster succinimidílico de QSY-7, ácido 4',5'-dinitrofluoresceincarboxílico, éster succinimidílico de QSY-33, desactivador I o "desactivadores Black Hole" (BHQ-1, BHQ-2 a BHQ-3), análogos de nucleótidos, restos nucleotídicos G, nanopartículas y partículas de oro.

C. Trifosfato de nucleósido

[0086] El término "trifosfato de nucleósido" se usa en este documento para referirse los nucleósidos presentes en el ADN o ARN y, por lo tanto, incluyen nucleósidos que incorporan adenina, citosina, guanina, timina y uracilo como base, en que la fracción de azúcar es desoxirribosa o ribosa. En general, los desoxirribonucleótidos se emplean en combinación con una ADN polimerasa. Sin embargo, se apreciará que pueden emplearse otras bases modificadas, capaces de aparearse con una de las bases convencionales adenina, citosina, guanina, timidina y uracilo. Tales bases modificadas incluyen, por ejemplo, 8-azaguanina e hipoxantina.

[0087] El término "nucleótido", según se usa en este documento, puede referirse a los nucleótidos presentes en el ADN o ARN y, por lo tanto, incluye nucleótidos que incorporan adenina, citosina, guanina, timina y uracilo como base, en que la fracción de azúcar es desoxirribosa o ribosa. Sin embargo, se apreciará que pueden emplearse otras bases modificadas, capaces de aparearse con una de las bases convencionales adenina, citosina, guanina, timidina y uracilo. Tales bases modificadas incluyen, por ejemplo, 8-azaguanina e hipoxantina.

[0088] En una realización, en la que se usa una ADN polimerasa con actividad exonucleasa 5', las condiciones de extensión comprenden los cuatro trifosfatos de desoxinucleósidos, con al menos uno de ellos sustituido (o modificado). El trifosfato de desoxinucleósido deberá modificarse de modo que se inhiba el corte por la actividad exonucleasa 5' de la ADN-polimerasa. Algunos ejemplos de tales trifosfatos de desoxinucleósidos pueden incluir 5'-O-(1-tiotrifosfato) de 2'-desoxiadenosina, 5'-trifosfato de 5-metildesoxicitidina, 5'-trifosfato de 2'-desoxiuridina y 5'-trifosfato de 7-deaza-2'-desoxiguanosina.

D. Enzima

[0089] Los procedimientos desvelados hacen uso de una polimerasa de ácido nucleico para la extensión del cebador. Puede usarse cualquier polimerasa de ácido nucleico. En algunas realizaciones, cuando la extensión del cebador de enriquecimiento bloquea la extensión iniciada a partir del cebador de amplificación, preferentemente las polimerasas usadas no tienen una actividad de desplazamiento de hebra, como la ADN-polimerasa Taq o el fragmento Stoffel de la polimerasa Taq. En otras realizaciones, en las que el cebador de enriquecimiento comprende una fracción bloqueante del extremo 3' que impide la extensión si no se elimina, la ADN-polimerasa comprende una actividad correctora o una actividad de pirofosforolisis, como las ADN-polimerasas Pfu, PWO, Pfx, Vent, AmpliTaqFS o ThermoSequenase. En otras realizaciones, en las que la extensión del cebador de enriquecimiento promueve la hibridación y la extensión del cebador de amplificación, preferentemente las polimerasas usadas tienen una actividad de desplazamiento de hebra o una actividad exonucleasa 5' a 3', como la polimerasa Vent (exo-) o la polimerasa Taq. Se prefiere especialmente que la ADN-polimerasa sea una ADN-polimerasa termoestable.

II. PROCEDIMIENTO

[0090] Los procedimientos de la técnica anterior (patente de los EE. UU. n° 5.891.625) usan oligómeros de análogos de nucleótidos, como APN, ANB, que hibridan fuertemente con los ácidos nucleicos para inhibir los procedimientos de amplificación de dichos ácidos nucleicos. Los procedimientos de la presente invención son fáciles de llevar a cabo a la luz de la presente descripción y son muy específicos. En algunas de las realizaciones reivindicadas en este documento, el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico y se extiende solamente cuando la región de diagnóstico de la secuencia diana contiene un nucleótido concreto. En una realización, el producto de extensión del cebador de enriquecimiento bloquea específicamente la extensión iniciada a partir de un cebador anterior, lo que impide la amplificación de la región diana que contiene el nucleótido concreto, mientras que la región diana que contiene el nucleótido variante se amplifica exponencialmente. En otra realización, la extensión del cebador de enriquecimiento abre una estructura de horquilla del molde y permite la hibridación y la extensión del cebador de amplificación. La amplificación usa un par de cebadores de amplificación que hibridan con la secuencia diana fuera de la región de diagnóstico, mientras que algunos procedimientos anteriores usan cebadores de amplificación que hibridan directamente con la región de diagnóstico, en que los errores de la reacción de PCR se malinterpretan a menudo como resultados positivos para la presencia de mutaciones raras. Adicionalmente, el producto de amplificación en la presente invención se enriquece en el ácido nucleico diana deseado, que puede tipificarse y analizarse de manera fidedigna mediante la sonda puente proporcionada en la presente invención o cualquier otro procedimiento como PCR en tiempo real, secuenciación de ADN y similares.

[0091] Deberá apreciarse que, mientras que el procedimiento de la presente invención es de especial interés para el enriquecimiento y la detección de la región de diagnóstico de ácidos nucleicos diana que contienen mutaciones puntuales, el procedimiento es igualmente aplicable al enriquecimiento y la detección de una región de diagnóstico con supresiones e inserciones, incluidas supresiones e inserciones de más de un nucleótido.

5 La presente invención también es valiosa para el enriquecimiento de regiones diana que contienen sustituciones de más de un nucleótido. A este respecto, solo es necesario conocer los nucleótidos pertinentes para poder diseñar apropiadamente el/los cebador(es) de enriquecimiento necesario(s). Por lo tanto, un "nucleótido variante", según se usa en este documento; no debe entenderse solamente como una sustitución, sino también potencialmente una inserción o supresión, en que la requerida complementariedad (por ejemplo, de la sonda o el cebador) se ajusta de 10 la manera correspondiente.

[0092] Se proporciona un procedimiento para el enriquecimiento y/o la detección de un ácido nucleico diana con al menos un nucleótido variante a partir de una población de ácidos nucleicos en una muestra, en que dicho procedimiento comprende:

15 (a) el tratamiento de la población de ácidos nucleicos con un cebador de enriquecimiento y un cebador de amplificación para una primera hebra de un molde de ácido nucleico que contiene la secuencia de ácido nucleico diana para crear una mezcla de moléculas dúplex (entre el cebador o cebadores y el ácido nucleico diana que tiene los nucleótidos variante o normal), en que el cebador de enriquecimiento y el cebador de amplificación son capaces 20 de hibridar con el molde en posiciones tales que el extremo 3' del cebador de amplificación sea anterior (generalmente adyacente o substancialmente adyacente) al extremo 5' del cebador de enriquecimiento, en que la secuencia nucleotídica de dicho cebador de enriquecimiento es tal que es sustancialmente complementaria de una 25 región de diagnóstico en la que se localiza el supuesto nucleótido variante, en que dicho dúplex contiene el cebador de enriquecimiento y el cebador de amplificación hibridados con el molde o comprende el cebador de amplificación hibridado con el molde;

(b) el mantenimiento de la mezcla de la etapa (a) en las condiciones de extensión, que comprenden los trifosfatos de nucleósidos apropiados y una polimerasa de ácido nucleico, para extender los cebadores hibridados, si son extensibles, para sintetizar los productos de extensión del cebador.

30 **[0093]** Según se describe más adelante, en una realización, el cebador de enriquecimiento hibridado no es extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante, pero el cebador de enriquecimiento hibridado se extiende para sintetizar el producto de extensión del cebador de enriquecimiento cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal, en que la extensión 35 del cebador de enriquecimiento bloquea la extensión del cebador de amplificación o promueve la hibridación y extensión del cebador de amplificación. Más específicamente, en la etapa (a) los dos cebadores, de enriquecimiento y de amplificación hibridan con el molde de ácido nucleico y en la etapa (b) el cebador de enriquecimiento hibridado no es extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante, con lo que el cebador de enriquecimiento se disocia de la secuencia diana en las condiciones de extensión y permite así 40 que la extensión del cebador de amplificación pase a través de la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante, en que el cebador de enriquecimiento se extiende para sintetizar el producto de extensión de dicho cebador de enriquecimiento cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal, con lo que la extensión del cebador de amplificación se bloquea por el producto de extensión del cebador de enriquecimiento.

45 **[0094]** En otra realización, en la etapa (a) el molde de ácido nucleico forma una estructura de horquilla en las condiciones de hibridación, en que la parte bicatenaria de la horquilla comprende un sitio de unión para un cebador de amplificación y el bucle de la horquilla comprende la secuencia de ácido nucleico diana, en que el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico en el bucle, en que, en la etapa (b), el cebador de enriquecimiento se extiende cuando hibrida con la región de diagnóstico con un nucleótido variante, en que esta extensión abre la estructura de horquilla y permite así al cebador de amplificación hibridar con el sitio de unión del cebador y promover la amplificación, en que el cebador de enriquecimiento no es extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico con un nucleótido normal, con lo que la estructura de horquilla se mantiene intacta e impide la hibridación de un cebador de amplificación con el sitio de unión del cebador. En esta realización, el procedimiento comprende además: etapa (c), el tratamiento de la mezcla de la etapa (b) en las condiciones de hibridación que permiten la hibridación del cebador de amplificación con el sitio de unión del cebador del molde en horquilla abierto y etapa (d), el mantenimiento de la mezcla de la etapa (c) en las condiciones de extensión para extender el cebador de amplificación hibridado, en que dichas condiciones de extensión comprenden los trifosfatos de nucleósidos apropiados, una polimerasa de ácido nucleico y un agente con actividad de desplazamiento de hebra o un agente 50 con actividad exonucleasa 5' a 3', en que dicha actividad de desplazamiento de hebra permite el desplazamiento del producto de extensión del cebador de enriquecimiento, en que dicha actividad exonucleasa 5' a 3' permite la degradación del producto de extensión del cebador de enriquecimiento. La degradación del producto de extensión 55 60

5 del cebador de enriquecimiento puede resultar en la generación de señales de detección debidas a los marcadores en el cebador de enriquecimiento o los trifosfatos de nucleósidos. Se prefiere que las etapas (a) a (d) se repitan en una reacción de amplificación que puede ser una amplificación por PCR o isotérmica. Preferentemente, la actividad de desplazamiento de hebra la proporciona la polimerasa. Preferentemente, la actividad exonucleasa 5' a 3' la proporciona la polimerasa.

10 [0095] El cebador de enriquecimiento puede comprender una fracción que hace que el producto de extensión del cebador de enriquecimiento sea inadecuado para una amplificación exponencial. En algunas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico usada puede ser una ADN-polimerasa con o sin actividad correctora. Si se usa una ADN-polimerasa con actividad correctora, el cebador de enriquecimiento puede comprender nucleótidos o enlaces modificados, especialmente el nucleótido o enlace del extremo 3', de modo que dicho cebador de enriquecimiento sea resistente al corte con nucleasas. El cebador de enriquecimiento puede ser un cebador oligonucleotídico ordinario a base de nucleótidos naturales y enlaces fosfodiéster; en otras palabras, puede que no comprenda ninguna fracción química o nucleótidos modificados. En esta realización, una parte o todo el cebador de enriquecimiento es degradable por una actividad nucleasa. Cuando el cebador de enriquecimiento hibrida con la 15 región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal en la secuencia diana, dicho cebador de enriquecimiento se extiende por una ADN-polimerasa con una actividad exonucleasa 5' en las condiciones de extensión que comprenden al menos un trifosfato de desoxinucleósido modificado. Una parte o todo el cebador de enriquecimiento se degrada por dicha actividad exonucleasa 5', mientras que una parte o toda la hebra extendida es 20 resistente al corte.

[0096] Se proporciona otro procedimiento que comprende:

25 (a) el tratamiento de la población de ácidos nucleicos con un primer cebador de enriquecimiento y un primer cebador de amplificación para una primera hebra de una secuencia de ácido nucleico diana para crear una mezcla de moléculas dúplex que comprenden el cebador de enriquecimiento y el cebador de amplificación hibridados con el ácido nucleico en las condiciones de hibridación, en que la secuencia nucleotídica de dicho cebador de amplificación es tal que es sustancialmente complementaria de la región de diagnóstico en la que se localiza el supuesto nucleótido variante, en que un nucleótido 3'-terminal del cebador de enriquecimiento es complementario del 30 supuesto nucleótido variante, en que el nucleótido 3'-terminal del cebador de enriquecimiento está modificado de modo que no es adecuado para la extensión con polimerasa, con lo que el cebador de enriquecimiento que hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante no es extensible, en que cuando el cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal, el nucleótido 3'-terminal incorrectamente apareado del cebador de enriquecimiento es eliminado por la actividad 35 correctora de una polimerasa de ácido nucleico, lo que hace que el cebador de enriquecimiento sea extensible, en que las moléculas dúplex comprenden el ácido nucleico diana hibridado con el cebador de enriquecimiento y el cebador de amplificación, de modo que el extremo 3' del cebador de amplificación es adyacente o anterior al extremo 5' del cebador de enriquecimiento;

40 (b) el mantenimiento de la mezcla de la etapa (a) en las condiciones de extensión, que comprenden los trifosfatos de nucleósidos apropiados y una polimerasa de ácido nucleico con actividad correctora, para extender los cebadores hibridados, si son extensibles, para sintetizar los productos de extensión del cebador, en que el cebador de enriquecimiento hibridado no es extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante a causa del extremo 3' bloqueado, con lo que el cebador de enriquecimiento se disocia de la 45 secuencia diana en las condiciones de extensión, las cuales pueden incluir una temperatura superior a la usada en las condiciones de hibridación, lo que permite que la extensión del cebador de amplificación pase a través de la región de diagnóstico que contiene un supuesto nucleótido variante, en que, cuando el cebador de hibridación hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal, el nucleótido incorrectamente apareado del extremo 3' es eliminado y, por lo tanto, tiene lugar la extensión para sintetizar el 50 producto de extensión del cebador de enriquecimiento, con lo que la extensión del cebador de amplificación queda bloqueada por el producto de extensión del cebador de enriquecimiento.

[0097] En otra realización, un cebador de enriquecimiento comprende un nucleótido 3'-terminal que se aparea correctamente con el nucleótido normal, mientras que se aparea incorrectamente con el nucleótido variante de la 55 región de diagnóstico. El cebador de enriquecimiento hibridado se extiende sobre el molde de la secuencia diana que contiene el nucleótido normal apropiado después de eliminar el nucleótido terminal del cebador por la actividad de pirofosforilisis de una ADN polimerasa, en que el producto de extensión del cebador de enriquecimiento bloquea la extensión de un cebador de amplificación anterior. El cebador de enriquecimiento hibridado no se extiende sobre el 60 molde que contiene el nucleótido variante y se disocia del molde, lo que permite que la extensión de un cebador de amplificación anterior pase a través de la región de diagnóstico. El producto de extensión del cebador de enriquecimiento puede copiarse parcialmente de manera lineal, mientras que el producto de extensión del cebador de amplificación puede amplificarse exponencialmente.

[0098] En otro procedimiento, el cebador de enriquecimiento puede comprender una secuencia de cola de nucleótidos o un ácido no nucleico en el lado 5' de la porción iniciadora del cebador de enriquecimiento, en que la secuencia de cola del lado 5' es complementaria o sustancialmente complementaria de un sitio de unión del cebador en el producto de extensión del cebador de enriquecimiento. Después de la desnaturalización e hibridación, el producto de extensión del cebador de enriquecimiento se repliega para formar una estructura de horquilla que bloquea el sitio de unión para el segundo cebador de amplificación, mientras que el producto de extensión del cebador de amplificación puede amplificarse exponencialmente.

5 **[0099]** Un procedimiento más comprende: (a) el tratamiento de la muestra con un primer cebador de enriquecimiento y un primer cebador de amplificación para una primera hebra de una secuencia de ácido nucleico diana y una sonda puente y un segundo cebador de amplificación para una segunda hebra de la secuencia de ácido nucleico diana, que es complementaria de la primera hebra del ácido nucleico diana, para crear un mezcla de moléculas dúplex que comprenden el cebador de enriquecimiento y el cebador de amplificación hibridados con el ácido nucleico en las condiciones de hibridación, en que la secuencia nucleotídica de dicho cebador de enriquecimiento es tal que es sustancialmente complementaria de la región de diagnóstico en la primera hebra del ácido nucleico diana donde se localiza el supuesto nucleótido variante, en que la primera porción de unión de la sonda puente es sustancialmente complementaria de la región de diagnóstico en la segunda hebra del ácido nucleico diana; (b) el mantenimiento de la mezcla de la etapa (a) en las condiciones de extensión, que comprenden los trifosfatos de nucleósidos apropiados y una polimerasa de ácido nucleico, para extender los cebadores hibridados, si son extensibles, para sintetizar los productos de extensión del cebador, en que el cebador de enriquecimiento hibridado no es extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante, con lo que el cebador de enriquecimiento se disocia de la secuencia diana en las condiciones de extensión, las cuales pueden incluir una temperatura superior a la usada en las condiciones de hibridación, lo que permite que la extensión del cebador de amplificación pase a través de la región de diagnóstico que contiene un supuesto nucleótido variante, en que el cebador de enriquecimiento hibridado se extiende para sintetizar el producto de extensión del cebador de enriquecimiento cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el correspondiente nucleótido normal, con lo que la extensión del cebador de amplificación queda bloqueada por el producto de extensión del cebador de enriquecimiento.

10 **[0100]** El procedimiento anterior puede comprender además la repetición de las etapas (a) y (b) en un procedimiento de amplificación. Es posible usar cualquier sistema de amplificación para incluir estas etapas, como PCR, SDA, LAMP, 3SR y similares. Un procedimiento de amplificación preferido para incorporar estas etapas es PCR.

15 **[0101]** En cualquiera de los procedimientos descritos en este documento, se proporciona una muestra de la que se supone que contiene el ácido nucleico diana y el nucleótido variante de interés. El ácido nucleico diana contenido en la muestra puede ser ADN genómico bicatenario o ADNc si es necesario, que entonces se desnaturala mediante cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado, incluidos medios físicos, químicos o 20 enzimáticos conocidos por los expertos en la técnica. Un medio físico preferido para la separación de las hebras implica el calentamiento del ácido nucleico hasta su desnaturalización completa (<99%). La desnaturalización por calor típica requiere temperaturas en el intervalo desde aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 105°C, durante períodos desde algunos segundos a minutos. Como alternativa a la desnaturalización, el ácido nucleico diana puede existir en forma monocatenaria en la muestra, como los virus de ARN o ADN monocatenarios.

25 **[0102]** Las hebras de ácido nucleico desnaturadas se incuban después con cebadores oligonucleotídicos en condiciones de hibridación; condiciones que permiten la unión de los cebadores a las hebras de ácido nucleico individuales. El cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico y puede extenderse o no. El cebador de amplificación hibrida con la hebra de ácido nucleico anterior al cebador de enriquecimiento y, cuando se extiende, pasa a través de la región de diagnóstico o su extensión queda bloqueada por el producto de extensión del cebador de enriquecimiento. En un aspecto, una reacción incluye un primer cebador de amplificación y un primer cebador de enriquecimiento que hibridan con la primera hebra de la secuencia diana y un segundo cebador de amplificación que hibrida con la segunda hebra de la secuencia diana, la cual es complementaria de la primera hebra de la secuencia diana. En otro aspecto, una reacción incluye un primer cebador de amplificación y un primer cebador de enriquecimiento que hibridan con la primera hebra de la secuencia diana y un segundo cebador de amplificación y un segundo cebador de enriquecimiento que hibridan con la segunda hebra de la secuencia diana, la cual es complementaria de la primera hebra de la secuencia diana.

30 **[0103]** En una realización, el molde de ácido nucleico forma una estructura de horquilla. El molde de ácido nucleico capaz de formar una estructura de horquilla puede crearse por la extensión de un primer cebador de amplificación sobre el ácido nucleico diana en la muestra. El primer cebador de amplificación comprende una secuencia de cola en el lado 5', que comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica complementaria del

sitio de unión del segundo cebador de amplificación. Los cebadores de amplificación primero y segundo son capaces de hibridar con el producto de extensión de los cebadores de amplificación segundo y primero, respectivamente, después de la separación de su complemento o de la estructura de horquilla. El molde de ácido nucleico puede crearse por las extensiones de los dos cebadores de amplificación, primero y segundo, sobre el ácido nucleico diana en la muestra. En otra realización, los dos cebadores de amplificación, primero y segundo, comprenden la misma secuencia de cola en el lado 5', en que dicha secuencia de cola en el lado 5' comprende una secuencia nucleotídica o no nucleotídica complementaria del sitio de unión de un tercer cebador de amplificación. El tercer cebador de amplificación está presente a concentraciones que exceden en gran medida las concentraciones de los cebadores de amplificación primero y segundo en la reacción. El tercer cebador de amplificación puede estar presente en la reacción a una concentración de al menos el doble de la concentración de los cebadores de amplificación segundo y primero. Preferentemente, el tercer cebador de amplificación puede estar presente en la reacción en una concentración de al menos el triple de la concentración de los cebadores de amplificación primero y segundo.

5 [0104] Los cebadores de amplificación se seleccionan de modo que sus posiciones relativas a lo largo de una secuencia dúplex sean tales que un producto de extensión sintetizado a partir del primer cebador de amplificación, cuando el producto de extensión se separa de su molde (complemento), sirva de molde para la extensión del segundo cebador de amplificación.

10 [0105] En la práctica del procedimiento, el cebador de enriquecimiento debe hibridar primero con un ácido nucleico complementario antes de que la extensión del cebador de amplificación bloquee el sitio de unión del cebador de enriquecimiento. Para conseguir esto, pueden emplearse diversas técnicas. Es posible colocar el cebador de enriquecimiento en una posición tal que el extremo 5' del cebador de enriquecimiento esté relativamente alejado del extremo 3' del cebador de amplificación, lo que da al cebador de enriquecimiento más tiempo para hibridar. También es posible usar un cebador de enriquecimiento con una Tm mayor que el cebador de amplificación. Por ejemplo, el cebador de enriquecimiento puede diseñarse de mayor longitud que el cebador de amplificación. La composición nucleotídica del cebador de enriquecimiento puede elegirse con un mayor contenido de G/C y, en consecuencia, una mayor estabilidad térmica que el cebador de amplificación. De manera similar, es posible incorporar en el cebador de enriquecimiento nucleótidos modificados que contengan análogos de bases que formen pares de bases más estables que las bases que están típicamente presentes en los ácidos nucleicos naturales.

15 [0106] Los parámetros de termociclado también pueden variarse para aprovechar la estabilidad térmica diferencial entre el cebador de enriquecimiento y los cebadores de amplificación. Por ejemplo, después de la etapa de desnaturalización en el termociclado, puede introducirse una temperatura intermedia que permita la unión del cebador de enriquecimiento pero no la unión del cebador de amplificación; la temperatura se aumenta entonces hasta la temperatura de extensión (por ejemplo, 72°C), con lo que se permite la extensión del cebador de enriquecimiento correctamente apareado y la disociación del cebador de enriquecimiento no extendido. Los ciclos de una temperatura intermedia y una temperatura de extensión pueden repetirse el número de veces que se desee para permitir la extensión del cebador de enriquecimiento correctamente apareado sobre tantos moldes diana como sea posible. La temperatura puede reducirse después para permitir la hibridación y la extensión del cebador de amplificación.

20 [0107] En algunas realizaciones, el producto de extensión del cebador de enriquecimiento funciona como bloqueante de la extensión de un cebador anterior y preferentemente no se usa como molde para amplificación; puede usarse y se prefiere una fracción que no puede copiarse incorporada en el cebador de enriquecimiento que bloquea la replicación de parte o todo el cebador de enriquecimiento. En principio, la fracción que no puede copiarse (fracción bloqueante) incluida en el cebador de enriquecimiento puede ser cualquier entidad que no sea reconocida como molde adecuado por una polimerasa. Es deseable que la fracción bloqueante (por ejemplo, dR-biotina, dR-amino) sea capaz de insertarse en oligonucleótidos sintéticos mediante la incorporación de los precursores adecuados (por ejemplo fosforamiditas) durante la síntesis *in vitro* del oligonucleótido.

25 [0108] La extensión dependiente del molde del(es) cebador(es) oligonucleotídico(s) está catalizada por un agente de polimerización en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), o de análogos de estos según se discute anteriormente, en un medio de reacción que consta de las sales, cationes metálicos y un sistema de tamponamiento del pH apropiados. Los agentes de polimerización adecuados son enzimas de las que se sabe que catalizan la síntesis de ADN dependiente del cebador y del molde. Las condiciones de reacción para la catalización de la síntesis de ADN con estas ADN-polimerasas son bien conocidas en la técnica.

30 [0109] La pirofosforolisis es la reacción inversa de la polimerización de ADN. En presencia de pirofosfato, el nucleótido del extremo 3' es eliminado del ADN dúplex para generar el trifosfato y el ADN dúplex acortado en el

35

40

45

50

55

60

extremo 3': $[dNMP]_n + PPi \rightarrow [dNMP]_{n-1} + dNTP$. En un procedimiento de la presente invención en el que se requiere pirofosforolisis para activar un cebador de enriquecimiento con un extremo 3' bloqueado, las condiciones de extensión pueden comprender unas condiciones apropiadas adecuadas para pirofosforolisis, que son bien conocidas en la técnica.

5 **[0110]** Cuando se extiende un cebador de enriquecimiento, también se extiende un cebador de amplificación anterior o un cebador de enriquecimiento anterior para otra región de diagnóstico, pero esta extensión se detendrá cuando sus hebras de extensión alcancen el producto de extensión del cebador de enriquecimiento posterior. Si el cebador de enriquecimiento comprende una fracción que no puede copiarse (bloqueante) o la parte del cebador de enriquecimiento en el producto de extensión del cebador de enriquecimiento se degrada, se impide una amplificación adicional del producto de extensión del cebador de enriquecimiento. En este documento, la expresión "amplificación adicional" indica específicamente una amplificación exponencial. En algunas realizaciones, se permite una replicación lineal (o amplificación polinómica) del producto de extensión del cebador de enriquecimiento, aunque no de todo el producto (figuras 1, 2, 3 y 4). En otra realización, se impiden tanto la replicación lineal como exponencial del producto de extensión del cebador de enriquecimiento (figura 5). Cuando un cebador de enriquecimiento hibridado no puede extenderse se disociará del molde, lo que permitirá una amplificación exponencial de la secuencia diana flanqueada por dos cebadores de amplificación y el enriquecimiento de la secuencia diana deseada.

20 **[0111]** El procedimiento comprende además la detección de la secuencia enriquecida deseada. La detección puede llevarse a cabo de manera simultánea con el proceso de enriquecimiento, por ejemplo, detección en tiempo real. En una reacción de enriquecimiento/amplificación puede incluirse una sonda de detección. Puede usarse cualquier sonda de detección; una sonda de detección preferida es la sonda puente. Una detección alternativa puede llevarse a cabo al final de la reacción de enriquecimiento. Es posible añadir una sonda al principio o al final de dicha reacción de enriquecimiento. Un análisis de curvas de fusión puede llevarse a cabo para detectar el supuesto nucleótido variante en el producto de amplificación enriquecido. Se prefiere la obtención de datos cuantitativos en la detección.

30 **[0112]** También es posible llevar a cabo la detección o verificación del enriquecimiento del ácido nucleico deseado después del enriquecimiento, lo que puede conseguirse por diversos procedimientos, como PCR en tiempo real o secuenciación de ADN.

35 **[0113]** Un procedimiento típico que usa una sonda puente para la detección se describe en la figura 7. La sonda puente no solo tiene una capacidad mejorada para distinguir diferencias de un solo nucleótido, debido a la corta longitud y elevada Tm de la primera porción de unión, sino que también evita la hibridación con toda la longitud del cebador de enriquecimiento, debido al hecho de que la segunda porción de unión hibrida con un área fuera de la región diana con la que ha de hibridar el cebador de enriquecimiento según su diseño. Deberá apreciarse que la sonda puente en la presente invención tiene muchas aplicaciones. Puede usarse para detectar un ácido nucleico diana en combinación con cualquier procedimiento de amplificación como PCR, SDA, LCR, RCA, LAMP, NASBA o similares. También puede usarse para detección del punto final y análisis de curvas de fusión.

40 **[0114]** En una realización, se proporciona un procedimiento para el análisis de una secuencia de ADN diana de una muestra biológica, en que dicho procedimiento comprende las etapas de

45 (a) adición a la muestra biológica de una cantidad eficaz de cebadores de amplificación y una sonda de ácido nucleico, en que uno de dichos cebadores de amplificación y la muestra están marcados, respectivamente, con un miembro de un par formado por un fluoróforo y un desactivador, de modo que, al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto, en que la sonda marcada hibrida con una copia amplificada de la secuencia de ácido nucleico diana a una distancia máxima de cinco nucleótidos del cebador marcado o la sonda marcada hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana y una parte del cebador marcado;

50 (b) amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana por un procedimiento de amplificación;

55 (c) iluminación de la muestra biológica con luz de una longitud de onda seleccionada que es absorbida por dicho fluoróforo; y

60 (d) detección de la emisión de fluorescencia de dicho fluoróforo o monitorización de la fluorescencia dependiente de la temperatura de dicho fluoróforo. Se prefiere que la sonda de ácido nucleico sea una sonda puente.

[0115] En otra realización, se proporciona un procedimiento para el análisis de una secuencia de ADN diana de una muestra biológica, en que dicho procedimiento comprende las etapas de

- (a) adición a la muestra biológica de una cantidad eficaz de cebadores de amplificación y dos sondas de ácido nucleico que hibridan con regiones adyacentes de la secuencia diana, en que una de dichas sondas está marcada con un fluoróforo y la otra sonda está marcada con un desactivador de un par de desactivación por contacto, de modo que, al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto, en que el fluoróforo y el desactivador se encuentran a una distancia máxima de cinco nucleótidos entre sí;
- (b) amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana por un procedimiento de amplificación;
- (c) iluminación de la muestra biológica con luz de una longitud de onda seleccionada que es absorbida por dicho fluoróforo; y
- (d) detección de la emisión de fluorescencia de dicho fluoróforo o monitorización de la fluorescencia dependiente de la temperatura de dicho fluoróforo. Se prefiere que una de las sondas de ácido nucleico sea una sonda puente.

[0116] El procedimiento de amplificación puede ser una amplificación isotérmica. Se prefiere que la amplificación sea una amplificación por ciclado térmico, que preferentemente es una PCR.

[0117] El procedimiento puede comprender además la etapa de determinación de un perfil de fusión del dúplex formado por sonda y diana.

[0118] Una sonda puente puede usarse para genotipificar SNP o detectar mutaciones. En una realización (figura 10A), el primer cebador aleloespecífico está marcado con un primer fluoróforo, por ejemplo Fam, mientras que el segundo cebador aleloespecífico está marcado con un segundo fluoróforo, por ejemplo Hex. El fluoróforo puede estar unido a un resto T cerca del extremo 3'. Si el SNP o la mutación diana están presentes en una muestra, uno o los dos cebadores aleloespecíficos se extienden para producir la hebra de extensión del cebador. Una sonda puente marcada con un desactivador en el extremo 3', por ejemplo BHQ-1, hibrida con la hebra de extensión del cebador en la primera porción de unión, mientras que la segunda porción de unión hibrida con la secuencia del cebador. Esta hibridación pone al fluoróforo y al desactivador en una estrecha relación de desactivación por contacto. Es muy importante que la porción de puente de la sonda puente tenga 1-3 nucleótidos que no hibriden con el cebador, de modo que el cebador no pueda hibridar y extenderse sobre la sonda. También es importante que la segunda porción de unión que hibrida con el cebador sea de corta longitud pero suficiente para hibridar con la diana. La porción de puente puede comprender también fracciones químicas no nucleotídicas para que no pueda actuar como molde y por lo tanto no pueda copiarse por una polimerasa. La hibridación de la sonda con el producto de extensión del cebador reduce la fluorescencia, de modo que la detección de la disminución de una fluorescencia concreta es un indicio de la presencia del SNP o la mutación concretos.

[0119] En otra realización (figura 10B), uno de los cebadores de amplificación capaces de hibridar con una región próxima a un SNP está marcado con un fluoróforo, por ejemplo Fam. El fluoróforo puede estar unido a un resto T cerca del extremo 3' del cebador. En la reacción de detección, el cebador marcado se extiende para producir la hebra de extensión del cebador. Una sonda puente marcada con un desactivador en el extremo 3', por ejemplo BHQ-1, hibrida con la hebra de extensión del cebador en la primera porción de unión, mientras que la segunda porción de unión hibrida con la secuencia del cebador. La primera región que se une con la primera porción de unión de la sonda puente contiene el sitio del SNP o la mutación. Esta hibridación pone al fluoróforo y al desactivador en una estrecha relación de desactivación por contacto. Es muy importante que la porción de puente de la sonda puente tenga 1-3 nucleótidos que no hibriden con el cebador, de modo que el cebador no pueda hibridar y extenderse sobre la sonda. También es importante que la segunda porción de unión que hibrida con el cebador sea de corta longitud pero suficiente para hibridar con la diana. La porción de puente puede comprender también fracciones químicas no nucleotídicas para que no pueda actuar como molde y por lo tanto no pueda copiarse por una polimerasa. La hibridación de la sonda con el producto de extensión del cebador reduce la fluorescencia del marcador debido al efecto de desactivación del desactivador en la sonda, de modo que la medida de la pérdida de una señal de fluorescencia concreta para un valor de Tm concreto es un indicio de la presencia del SNP o la mutación concretos. La Tm de la unión de la sonda puente puede determinarse por análisis de curvas de fusión.

[0120] Los procedimientos pueden comprender la etapa de la determinación de la temperatura para la máxima tasa de pérdida de fluorescencia de la sonda. La fluorescencia de la reacción como función de la temperatura puede determinarse durante la reacción en cadena de la polimerasa.

[0121] La sensibilidad de las reacciones anteriores aumentaría en gran medida si el cebador marcado pudiera generar productos monocatenarios. Un procedimiento para la generación de productos finales monocatenarios puede ser el procedimiento denominado reacción de desplazamiento en cadena de la polimerasa (PCDR) (Fu G,

2007, solicitud de patente internacional nº PCT/GB2007/003793). Un cebador enlazado capaz de inducir la generación de un producto final monocatenario se incorpora en una reacción de PCDR en la que una sonda puente puede usarse para detectar una secuencia diana.

- 5 **[0122]** En el diseño de la sonda de hibridación según se describe en la patente de los EE. UU. nº 6.174.670, se diseñan dos sondas marcadas para que hibriden próximas entre sí en una secuencia diana e interaccionen por FRET, en que los fluoróforos donador y aceptor no deben estar en contacto inmediato entre sí, ya que esto disminuiría la intensidad de emisión de los fluoróforos. Por lo tanto, las secuencias diana para cada sonda se encuentran al menos a cinco nucleótidos de distancia para impedir la desactivación por contacto y maximizar la emisión a partir del aceptor. Mientras tanto, en las realizaciones de esta invención se diseña un par de sondas marcadas para que hibriden próximas entre sí en una secuencia diana e interaccionen por desactivación por contacto, en que el fluoróforo y el desactivador deben estar en contacto inmediato entre sí, ya que esto maximizará el efecto de desactivación y por consiguiente disminuirá la emisión de los fluoróforos. Por lo tanto, la secuencia diana para cada sonda es normalmente de al menos cinco nucleótidos para conseguir la desactivación por contacto. Existen varias ventajas en el uso de la desactivación por contacto en lugar de FRET. En primer lugar, el procedimiento de la presente invención permite una multiplicidad máxima mientras que, en las sondas basadas en FRET, ambos fluoróforos, aceptor y donador, ocupan un canal de detección, lo que limita el número de dianas que pueden detectarse. En segundo lugar, la desactivación por contacto es más efectiva, por lo tanto la disminución de la señal de la desactivación por contacto es más marcada que en FRET. En tercer lugar, el diseño de las sondas de FRET es más complicado que el de las sondas de desactivación por contacto. Para las sondas de FRET los dos marcadores deben estar situados a una distancia apropiada para que tenga lugar FRET; el solapamiento espectral entre el espectro de emisión del fluoróforo y el espectro de absorción del aceptor es un importante determinante de la eficacia de FRET. El solapamiento espectral no es un determinante significativo de la eficacia de desactivación en la desactivación por contacto y las eficacias de desactivación siguen siendo muy altas en ausencia de solapamiento espectral.

- 30 **[0123]** En una realización más se proporcionan múltiples sondas puente para permitir la detección múltiple de ácidos nucleicos, de nucleótidos variantes en un solo ácido nucleico diana o para la exploración de mutaciones desconocidas. Cada una de las sondas puente contiene al menos dos porciones de unión enlazadas por una porción de puente, en que la primera porción de unión es capaz de hibridar con una región de interés en un ácido nucleico diana y en que la segunda porción de unión es capaz de hibridar con una región adyacente o sustancialmente adyacente a la región de interés en el ácido nucleico diana. La región de interés en el ácido nucleico diana puede ser una región de diagnóstico con supuestos nucleótidos variantes.

- 35 **[0124]** Los reactivos empleados en los procedimientos pueden envasarse en kits de ensayo. Los kits de ensayo incluyen cebadores de enriquecimiento para cada región de diagnóstico de una secuencia de ácido nucleico diana, en que un nucleótido terminal en el extremo 3' de un cebador de enriquecimiento es complementario de un supuesto nucleótido variante o del correspondiente nucleótido normal, de modo que, en uso, se sintetiza un producto de extensión del cebador de enriquecimiento cuando dicho nucleótido terminal del cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico con el correspondiente nucleótido normal, mientras que el cebador de enriquecimiento no es extensible cuando dicho nucleótido terminal del cebador de enriquecimiento hibrida con la región de diagnóstico que contiene el nucleótido variante; y los correspondientes cebadores primero y segundo para la amplificación de una secuencia diana que contiene la región de diagnóstico con la que hibrida el cebador de enriquecimiento. El kit puede contener también otros reactivos y materiales envasados adecuadamente necesarios para la amplificación, por ejemplo, cebadores de amplificación, tampones, dNTP y/o agentes de polimerización, y el análisis de detección, así como instrucciones para llevar a cabo el ensayo.

- 50 **[0125]** En otra realización, el kit de ensayo incluye sondas y cebadores para cada reacción de diagnóstico de una secuencia de ácido nucleico diana, en que las sondas y los cebadores comprenden marcadores que son pares de desactivación por contacto y, al hibridar con el ácido nucleico, los marcadores quedan en una relación de desactivación por contacto. El kit puede incluir también una sonda puente que comprende al menos dos porciones de unión enlazadas por una porción de puente, en que la primera porción de unión es capaz de hibridar con una primera región de un ácido nucleico molde y en que la segunda porción de unión es capaz de hibridar con una segunda región adyacente o sustancialmente adyacente a la primera región del ácido nucleico molde. La primera región del ácido nucleico molde puede ser una región de interés en un ácido nucleico diana, la cual puede ser una región de diagnóstico con supuestos nucleótidos variantes.

- 55 **[0126]** Por lo tanto, algunos kits son aquellos adaptados a la realización de los procedimientos definidos en este documento, por ejemplo, que incluyen combinaciones de cebadores de enriquecimiento y amplificación e instrucciones escritas para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos definidos en este documento. Por lo tanto, con respecto al primer aspecto, típicamente el cebador de enriquecimiento tendrá un nucleótido 3'-terminal complementario del supuesto nucleótido variante o del correspondiente nucleótido normal. Típicamente, el cebador

de amplificación estará adaptado para hibridar con una diana de modo que el extremo 3' del cebador de amplificación sea adyacente o anterior al extremo 5' del cebador de enriquecimiento. Preferentemente, el cebador de enriquecimiento comprende una fracción que hace que el producto de extensión del cebador de enriquecimiento sea inadecuado para una amplificación exponencial, es decir, hace que no pueda copiarse, según se describe anteriormente. Opcionalmente, el cebador de enriquecimiento comprende también nucleótidos o enlaces modificados que hacen todo o parte del cebador de enriquecimiento resistente al corte con nucleasas. El kit puede incluir también una polimerasa de ácido nucleico que comprende una actividad exonucleasa 5'.

[0127] La invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. A la luz de estos, otras realizaciones se les ocurrirán a los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0128] Todos los cebadores y sondas usados en los siguientes experimentos fueron sintetizados por EUROGENETEC, Reino Unido. Las reacciones de PCR en tiempo real y los análisis de curvas de fusión se realizaron en un aparato de PCR en tiempo real Chromo4 de Bio-Rad o MX3005P de Stratagene. Los cebadores se diseñaron para la amplificación del gen BRAF como secuencia de ADN diana a partir de plásmidos que comprendían un fragmento del gen BRAF normal y un fragmento del gen BRAF mutado (con V599E). La secuencia de este fragmento génico comprende la secuencia:

```
gaaaagcatctcacctatcctaacacattcaagccccaaaaatctaaaaggcaggttataggtctaaatagaactaatcattgttt
tagacatacttattgactctaagagggaaagatgaagttactatgtttaaagaatattatattacagaattatagaaatttagatctttacct
aaactctcataatgctgctgtataggaaaatgagatctactgtttcccttacttactacacacctcagatatatttcctcatgaagacacct
cagtaaaaataggtgatttggctagctacagtgaaatctcgatggagtgggtcccatcagttgaacagttgtctggatccatttgtg
gatggttaagaattgaggctatttccactgattaaattttggccctgagatgctgctgagttactagaaagtcatgtaaaggctcaacta
tagtatttcatagttcccagtattcac
```

[0129] Las secuencias de los cebadores son:

BrafF2	GGAAAGCATCTCACCTCATCCTAACAC
BrafEndR2	GACTTTCTAGTAACTCAGCAGCATCTCA
BraFAMR2	GGACCCACTCCATCG1GATTTC2A

En que "1" es dR-biotina, "2" es un enlace fosforotioato. Todas las secuencias nucleotídicas están escritas en la dirección 5' a 3', a menos que se indique lo contrario. En este caso, BraFAMR2 es un cebador de enriquecimiento.

[0130] Los cebadores se diluyeron hasta una concentración final de 10 µM. La amplificación se llevó a cabo con los ingredientes y condiciones siguientes: 2,5 µl de tampón de PCR 10x (tampón para el fragmento Stoffel de Applied Biosystems), 0,5 µl de dNTP 10 mM, 0,5 µl de cada cebador, si se añade, 0,5 µl del fragmento Stoffel, 0,25 µl de ADN-polimerasa AmpliTaq (5 U/µl), 0,5 µl de ADN plasmídico (10^5 moléculas) y agua hasta un volumen final de 25 µl. Las reacciones se llevaron a cabo a 94°C durante 1 min; 40 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 57°C, 1 s a 68°C, 15 s a 60°C en una máquina de PCR BioMetra. Los cebadores añadidos a las reacciones son como sigue:

Número de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BrafF2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BrafEndR2	+	+	-	+	+	-	+	+	-
BraFamR2	-	+	+	-	+	+	-	+	+
ADN normal	-	.	-	-	-	-	+	+	+
ADN mutado	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M/N = 1/100	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ADN									

M/N = 1/100 ADN indica el ADN plasmídico que contiene el ADN mutado y el ADN normal en una relación 1:100

[0131] Después de la reacción de PCR, los productos de ADN amplificados se cargaron en un gel de agarosa.

El ADN de los tubos n° 2, 4, 5, 7 y 8 fue secuenciado con los cebadores BrafendR2 y BrafendinR2 (con la secuencia GCCTCAATTCTTACCATCCACAA) por GATC Ltd. El producto de PCR enriquecido con la mutación del tubo 5 de PCR mostró que la base secuenciada era de tipo mutado, mientras que el producto de PCR no enriquecido del tubo 4 mostró que la base de la secuencia era del tipo normal.

- 5 **Ejemplo 2**
- Análisis de curvas de fusión de una sonda puente hibridada con moldes correcta e incorrectamente apareados.
- 10 **[0132]** Se diseña una sonda puente PadLfam con la secuencia siguiente
GAGCCGTCGGTGGTCAAaaaaaaaCATGACGAGCCCTA, en la que el extremo 5' está marcado con 6-Fam y el extremo 3' está marcado con BHQ1. Las porciones de unión se indican en letras mayúsculas y la porción de puente en letras minúsculas.
- 15 **[0133]** Se diseñan además dos oligonucleótidos molde, que son: PadLTemp ATAGACCACCGACGGC-TCATTAGGGCTCGTCATGTAAC y PadLTempM ATAGACCACCGACGGCTCATTAGGGCTAGTCATGTAAC, en que PadLTempM contiene un solo nucleótido diferente que está subrayado.
- 20 **[0134]** La sonda puente PadLfam hibrida con sus moldes de la manera que se indica en la figura 6A. Un análisis de curvas de fusión se llevó a cabo según se muestra en la figura 9A. Se observó una diferencia de 6 grados en la Tm entre el molde correctamente apareado (línea 2) y el molde con un solo nucleótido diferente (línea 1) hibridados con la sonda puente.
- 25 **Ejemplo 3**
- 25 La diferente longitud de las porciones de puente de una sonda puente afecta a la Tm
- 30 **[0135]** Se diseñan dos sondas puente SunDab y SunDabA13, cuyos los extremos 3' están marcados con Dabcyl, de la manera siguiente. La sonda SunDan no tiene porción de puente, mientras que la sonda SunDabA13 contiene una porción de puente con 13 A. Una segunda sonda SunFam contiene dos regiones complementarias de la primera porción de unión y la segunda porción de unión de la sonda puente y está marcada con 6-Fam en el extremo 5'. Se diseña otro oligonucleótido SunTemp con una región complementaria de una parte de la segunda sonda. Los alineamientos que muestran las regiones de unión son los siguientes, en que "F" significa 6-Fam, "Q" significa Dabcyl, "-" significa ningún nucleótido, "I" significa bases complementarias, "P" indica grupo fosfato.
- 35 SunFam 5' FCACCGCGCTTAGTTACATGACGAGCCGTGTAGCGTGGACGACAGAGG-P 3'
 |||||||
- 40 SunDab 3' QGTGGCG-----CACATCGCACCTGCTGTCTCC 5'
 |||||
- 40 SunFam 5' FCACCGCGCTTAGTTACATGACGAGCCGTGTAGCGTGGACGACAGAGG-P 3'
 |||||||
- 45 SunDabA13 3' QGTGGCG---AAAAAAAAAAAA---CACATCGCACCTGCTGTCTCC 5'
 |||||
- 45 SunFam 5' FCACCGCGCTTAGTTACATGACGAGCCGTGTAGCGTGGACGACAGAGG-P 3'
 |||||||
- 50 SunTemp 3' CCCAAAGTGGCGGAATCAATGACTGCTCGGGATTACTC 5'
- 50 **[0136]** El análisis de curvas de fusión se llevó a cabo con las siguientes combinaciones de oligonucleótidos:
- | Número de tubo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|
| SunFam | + | + | + | + | + | + |
| SunDab | - | + | - | + | - | - |
| SunTemp | - | - | + | + | - | + |
| SunDabA13 | - | - | - | - | + | + |
- 55 **[0137]** El resultado se muestra en la figura 9B, que demuestra que la diferencia en la porción de puente (tubos 2 y 5) tiene un gran efecto en la Tm. La sonda puente SunDabA13 que tiene una extensa porción de puente muestra una alta Tm, especialmente para la porción de unión con la secuencia de poca longitud (tubo 5).

Ejemplo 4

Amplificación con marcadores de un par de desactivación por contacto

5 [0138] Los cebadores de amplificación y las sondas son BrafEndinR2, GCCTCAATTCTTACCATCCACAA; BrafEndR2, GACTTTCTAGTAACTCAGCAGCATCTCA; BraFamR2, GGACCCCCTCCATCG1GATTTTC2A ("1" es dR-biotina, "2" es un enlace fosforotioato); BraPCDRF, ctacacccatcgatataatttcttcgtaaag, marcado con Fam en el extremo 5'; BraBridge, ATCACCTATTTTACTGTGAGGTCAAAGGGTAG, marcada con BHQ-1 en el extremo 3'.

10 [0139] En cebador de amplificación BraPCDF y la sonda BraBridge se marcan respectivamente con Fam y BHQ-1, de modo que al hibridar las sondas con los productos amplificados, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto.

15 [0140] Los cebadores se diluyeron hasta una concentración final de 10 µM. La amplificación se llevó a cabo con el uso de los ingredientes y condiciones siguientes: 2,5 µl de tampón de PCR 10x (tampón NEB Thermo), 0,5 µl de dNTP 10 mM, 0,5 µl de cada cebador, si se añade, 0,5 µl de ADN-polimerasa Vent (exo-) o Taq (5 U/µl), 0,5 µl de ADN plasmídico (10^5 moléculas) y agua hasta un volumen final de 25 µl. Las reacciones se llevaron a cabo a 94°C durante 1 min; 36 ciclos de 9 s a 94°C, 30 s a 51°C, (lectura de fluorescencia), 30 s a 72°C, 30 s a 51°C (lectura de fluorescencia) y 30 s a 72°C en una máquina de PCR en tiempo real Chromo4 de BioRad. Los cebadores añadidos a las reacciones son como sigue:

Número de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
BraPCDRF	+	+	+	+	+	+	+	+
BraBridge	+	+	+	+	+	+	+	+
BraFamR2	-	+	-	+	-	+	-	+
BrafEndinR2	+	+	-	-	+	+	-	-
BrafendR2	-	-	+	+	-	-	+	+
Vent	+	+	+	+	-	-	-	-
Taq	-	-	-	-	+	+	+	+
ADN normal (3744)	+	+	+	+	+	+	+	+

25 [0141] La amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana se llevó a cabo por el procedimiento de PCR en tiempo real; la muestra biológica se iluminó con luz de 492 nm de longitud de onda que es absorbida por Fam; y se detectó la emisión de fluorescencia de dicho fluoróforo y se monitorizó la fluorescencia dependiente de la temperatura de dicho fluoróforo.

30 [0142] En todas las reacciones se observó una disminución de las señales de fluorescencia, lo que indica que las dianas estaban presentes en todas las muestras.

Ejemplo 5

35 [0143] Se diseñan pares de cebadores de amplificación, de modo que un cebador contiene una secuencia de cola en el lado 5' que es idéntica al otro cebador en el par.

40 [0144] Los cebadores de amplificación y la sonda son: JKR3ccF2, GATGCTCTGAGAAAGGCATTAGAAAGC-ATCTTATTATGGCAGAGAGAA; JKR3, GATGCTCTGAGAAAGGCATTAGA; JKFaMdR, GTTTACTTACTCTC-GTCTCCAC6GAA, en este cebador, la "T" en la posición 11 es BHQ-1(dT), "6" es Fam-dR.

45 [0145] Los cebadores se diluyen hasta una concentración final de 10 µM. La amplificación se lleva a cabo con los ingredientes y condiciones siguientes: 3 µl de tampón de PCR 10x (tampón NEB Thermo), 5 µl de betaina, 0,5 µl de dNTP 10 mM, 1,25 µl del cebador JKR3, 0,5 µl del cebador JKR3ccF2, 1 µl de JKFaMdR, si se añade, 0,25 µl de ADN-polimerasa Taq (5 U/µl), 0,5 µl de ADN plasmídico (10^5 moléculas) y agua hasta un volumen final de 25 µl. Las reacciones se llevaron a cabo a 94°C durante 1 min; 40 ciclos de 15 s a 95°C, 18 s a 61°C, 18 s a 54°C, 18 s a 72°C, 20 s a 60°C, 25 s a 72°C y 30 s a 72°C (se recogen datos a cada temperatura) en una máquina de PCR en tiempo real MX3005 de Stratagene. El molde plasmídico es una mezcla de ADN mutado que contiene V617F y ADN natural. El procedimiento comprende la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana por PCR en tiempo real; la iluminación de la muestra biológica con luz de 492 nm de longitud de onda que es absorbida por Fam; y la detección de la emisión de fluorescencia de dicho fluoróforo y la monitorización de la fluorescencia dependiente de la temperatura de dicho fluoróforo.

[0146] El producto de extensión del cebador JKR3ccF2 desnaturalizado forma una estructura de horquilla en las condiciones de hibridación. El cebador R3 es incapaz de hibridar debido a la estructura de horquilla. El cebador de enriquecimiento JKFamdR hibrida con la porción del bucle de la horquilla y se extiende si hibrida con el nucleótido mutado. La extensión del cebador JKFamdR abre la estructura de horquilla, lo que permite al cebador R3 hibridar y extenderse. La extensión del cebador R3 degrada el producto de extensión del cebador de enriquecimiento debido a la naturaleza exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq. El producto de extensión del cebador de enriquecimiento puede ser desplazado también si la polimerasa tiene una actividad de desplazamiento de hebra. Si el cebador de enriquecimiento hibrida con el ADN natural, que contiene un nucleótido que se aparea incorrectamente con el nucleótido terminal del cebador, el cebador de enriquecimiento no se extiende, con lo que la estructura de horquilla se mantiene intacta. Esto resulta en el enriquecimiento del ADN que contiene el nucleótido mutado. El cebador de enriquecimiento comprende los marcadores Fam y BHQ. La degradación del producto de extensión del cebador de enriquecimiento da una señal de fluorescencia. Esta reacción permite el enriquecimiento y la detección del ácido nucleico diana en un solo tubo.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el enriquecimiento de un ácido nucleico diana con al menos un nucleótido variante a partir de una población de ácidos nucleicos en una muestra, en que el procedimiento comprende:
- (a) el tratamiento de la muestra con un cebador de enriquecimiento y un cebador de amplificación para una primera hebra de la secuencia de ácido nucleico diana para crear una mezcla de moléculas dúplex, en que la mezcla de moléculas dúplex comprende el cebador de enriquecimiento y el cebador de amplificación hibridados con el molde de ácido nucleico diana en las condiciones de hibridación, en que la secuencia nucleotídica de dicho cebador de enriquecimiento es tal que es sustancialmente complementaria de una región de diagnóstico en la que se localiza el supuesto nucleótido variante, pero en que un nucleótido en el extremo 3' o a uno, dos o tres nucleótidos de este es complementario del correspondiente nucleótido normal, y en que el cebador de amplificación hibrida con el ácido nucleico diana de modo que el extremo 3' del cebador de amplificación es anterior al extremo 5' del cebador de enriquecimiento;
- (b) el mantenimiento de la mezcla de la etapa (a) en las condiciones de extensión, que comprenden los trifosfatos de nucleósidos apropiados y una polimerasa de ácido nucleico que opcionalmente es termoestable, para extender los cebadores hibridados, si son extensibles, para sintetizar los productos de extensión de los cebadores;
- (c) la repetición de las etapas (a) y (b) en una reacción de amplificación que es una reacción de PCR; en que el cebador de enriquecimiento hibridado no es extensible cuando hibrida con la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante, con lo que el cebador de enriquecimiento se disocia de la secuencia diana, lo que permite que la extensión del cebador de amplificación pase a través de la región de diagnóstico que contiene el supuesto nucleótido variante, y en que la extensión del cebador de enriquecimiento tiene lugar cuando hibrida con la porción de diagnóstico del ácido nucleico diana que tiene el nucleótido normal para sintetizar un producto de extensión del cebador de enriquecimiento que bloquea la extensión iniciada a partir del cebador de amplificación cuando este hibrida con el ácido nucleico diana que tiene el nucleótido normal, lo que permite la amplificación preferencial del ácido nucleico diana que tiene el nucleótido variante.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el nucleótido 3'-terminal del cebador de enriquecimiento es complementario del correspondiente nucleótido normal.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en que el cebador de enriquecimiento comprende una fracción que hace que el producto de extensión del cebador de enriquecimiento sea inadecuado para una amplificación exponencial.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en que dicha fracción es una fracción bloqueante que no es adecuada como molde para una polimerasa de ácido nucleico, en que la replicación de todo o parte de dicho cebador de enriquecimiento está bloqueada, en que dicha fracción bloqueante es
- (i) un brazo de hidrocarburo, un enlace no nucleotídico, un ácido peptidonucleico, derivados de nucleótidos, ribosa abásica o un colorante;
- (ii) está situada a menos de tres nucleótidos de distancia del extremo 3' del cebador de enriquecimiento;
- (iii) está situada a menos de seis nucleótidos del extremo 3' del cebador de enriquecimiento o
- (iv) está situada a menos de 18 nucleótidos de distancia del extremo 3' del cebador de enriquecimiento.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en que dicho cebador de enriquecimiento comprende nucleótidos o enlaces modificados que hacen que todo o parte del cebador de enriquecimiento sea resistente al corte con nucleasas.
6. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 5, en que los últimos cinco nucleótidos o enlaces en el extremo 3' y/o el extremo 5' están modificados de modo que el cebador de enriquecimiento es resistente al corte con nucleasa y/o en que el último nucleótido o enlace en el extremo 3' y/o el extremo 5' están modificados de modo que el cebador de enriquecimiento es resistente al corte con nucleasas.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en que en la etapa (a) la mezcla de reacción comprende un cebador de enriquecimiento y/o un cebador de amplificación adicionales para la segunda hebra de la secuencia diana que es complementaria de dicha primera hebra de la secuencia diana.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la detección del ácido nucleico diana enriquecido, en que dicha detección se realiza por medio de una sonda puente, en que la sonda puente comprende al menos dos porciones de unión enlazadas por una porción de puente, en que la primera porción de unión es capaz de hibridar con una primera región del molde de ácido nucleico y en que la segunda porción de unión es capaz de hibridar con una segunda región del molde de ácido nucleico que es adyacente o sustancialmente adyacente a la primera región del molde de ácido nucleico y en que la primera región del molde de ácido nucleico diana contiene el supuesto nucleótido variante, en que dicha porción de puente comprende una secuencia con al menos un nucleótido o al menos una fracción química no nucleotídica que es incapaz de hibridar con el molde de ácido nucleico y en que la longitud y/o la composición de dicha porción de puente está adaptada para determinar la temperatura de fusión (Tm) de las porciones de unión individuales y/o la Tm de la sonda puente.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que
- (i) dicha primera región del molde de ácido nucleico es una región en la parte extendida del producto de extensión de un cebador, en que dicha segunda región es una parte del cebador o de una sonda, o
 - (ii) dichas primera y segunda regiones del molde de ácido nucleico son ambas parte de un cebador de amplificación o de una sonda.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en que la porción de unión de la sonda puente hibrida con el ácido nucleico diana con nucleótidos apareados correcta o incorrectamente a diferentes temperaturas de fusión, las cuales se miden y son indicio de la presencia o ausencia de un supuesto nucleótido variante.
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en que
- (i) un extremo de dicha porción de puente está unido al extremo 5' de la primera porción de unión y otro extremo de la porción de puente está unido al extremo 3' de la segunda porción de unión o
 - (ii) un extremo de dicha porción de puente está unido al extremo 5' de la primera porción de unión y otro extremo de dicha porción de puente está unido al extremo 5' de la segunda porción de unión o en que un extremo de dicha porción de puente está unido al extremo 3' de la primera porción de unión y otro extremo de dicha porción de puente está unido al extremo 3' de la segunda porción de unión.
12. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en que los extremos de dicha sonda puente
- (i) se enfrentan entre sí cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico diana o
 - (ii) apuntan en direcciones opuestas cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico diana o
 - (iii) apuntan en la misma dirección cuando la sonda puente hibrida con un ácido nucleico diana.
13. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en que la sonda y/o el cebador comprenden marcadores de detección.
14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en que la primera porción de unión está unida con un primer marcador y la segunda porción de unión está unida con un segundo marcador y
- (i) dichos marcadores primero y segundo son pares de desactivación por contacto, en que uno de los marcadores es un desactivador y en que, al hibridar las sondas con la secuencia diana, los marcadores primero y segundo quedan en una relación de desactivación por contacto, o
 - (ii) dichos marcadores primero y segundo son pares de transferencia de energía de fluorescencia y en que, al hibridar las sondas con la secuencia diana, los marcadores primero y segundo quedan en una relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en que la segunda porción de unión y la parte del cebador que es capaz de hibridar con la segunda porción de unión de la sonda puente están unidas respectivamente a un miembro de un par de unión formado por fluoróforo y desactivador, de modo que al hibridar la sonda puente con la hebra de extensión del cebador, el fluoróforo y el desactivador quedan en una relación de desactivación por contacto.

16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en que dicho desactivador es

5 (i) una entidad no fluorescente o

(ii) una nanopartícula o

(iii) un resto G o múltiples restos G.

10 17. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-7 que comprende la detección del ácido nucleico diana Enriquecido.

FIG. 1

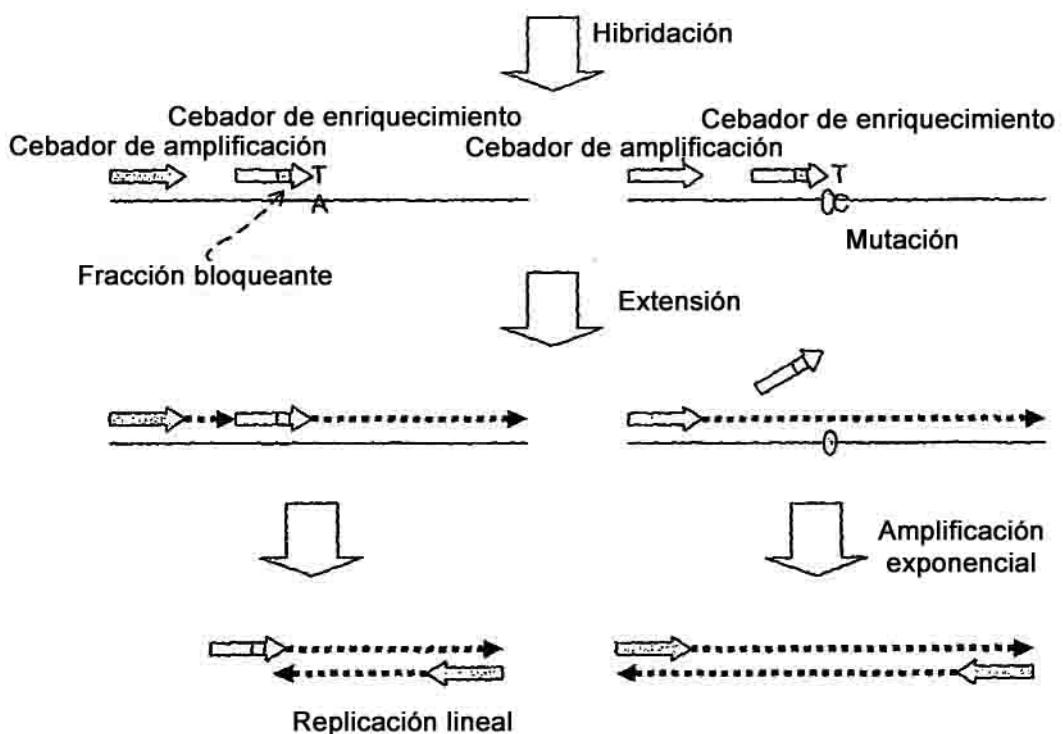


FIG. 2

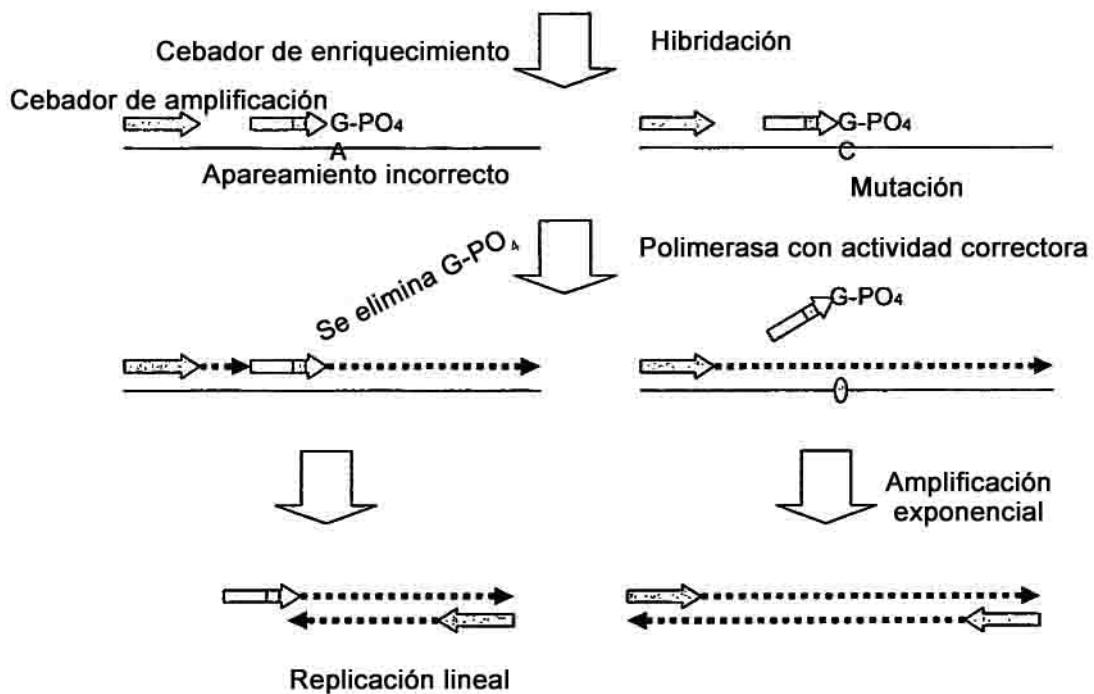


FIG. 3

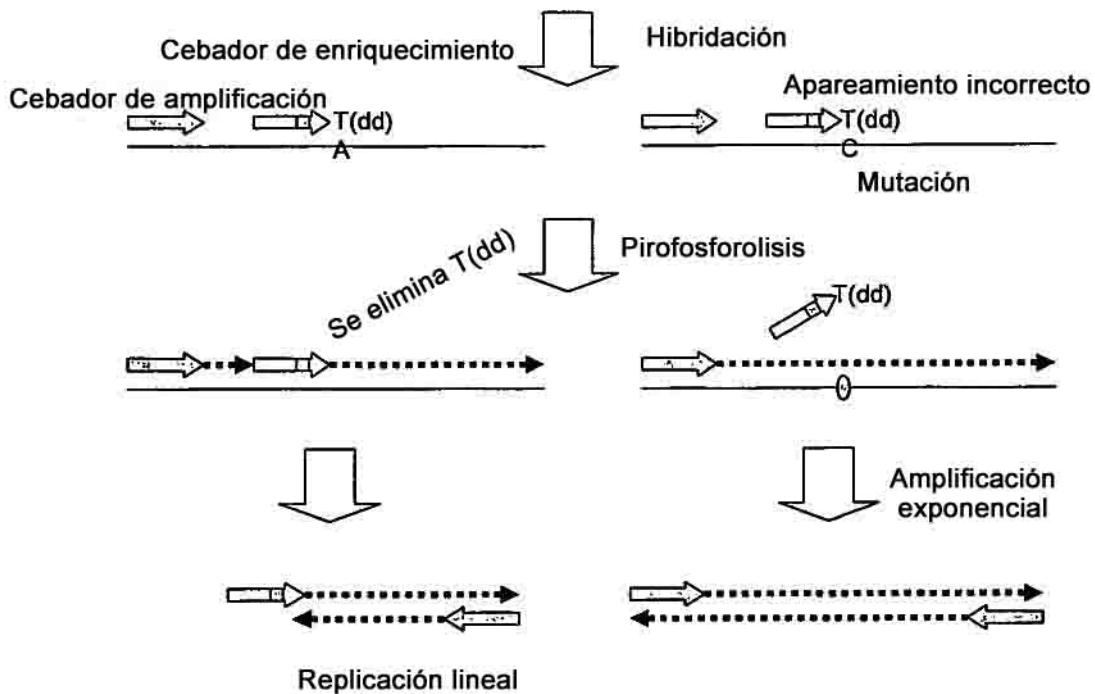


FIG. 4

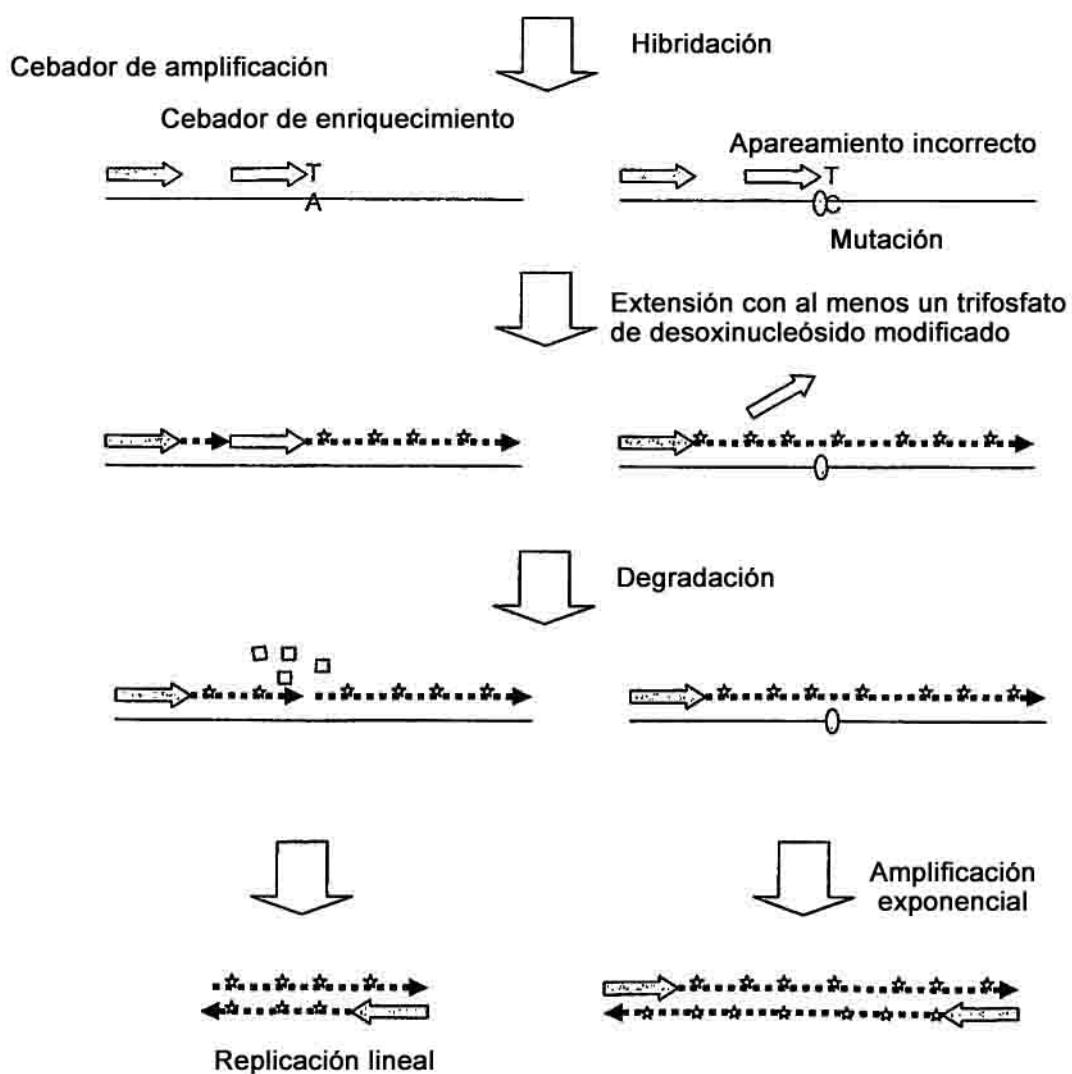


FIG. 5

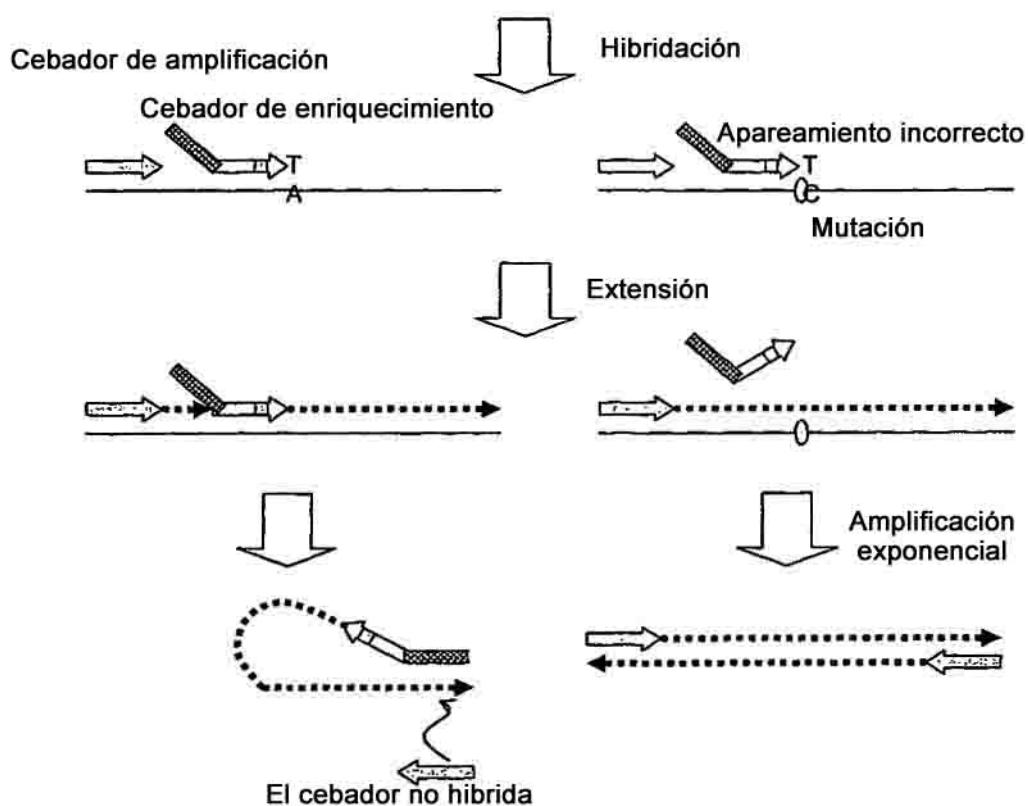


FIG. 6

Sonda puente

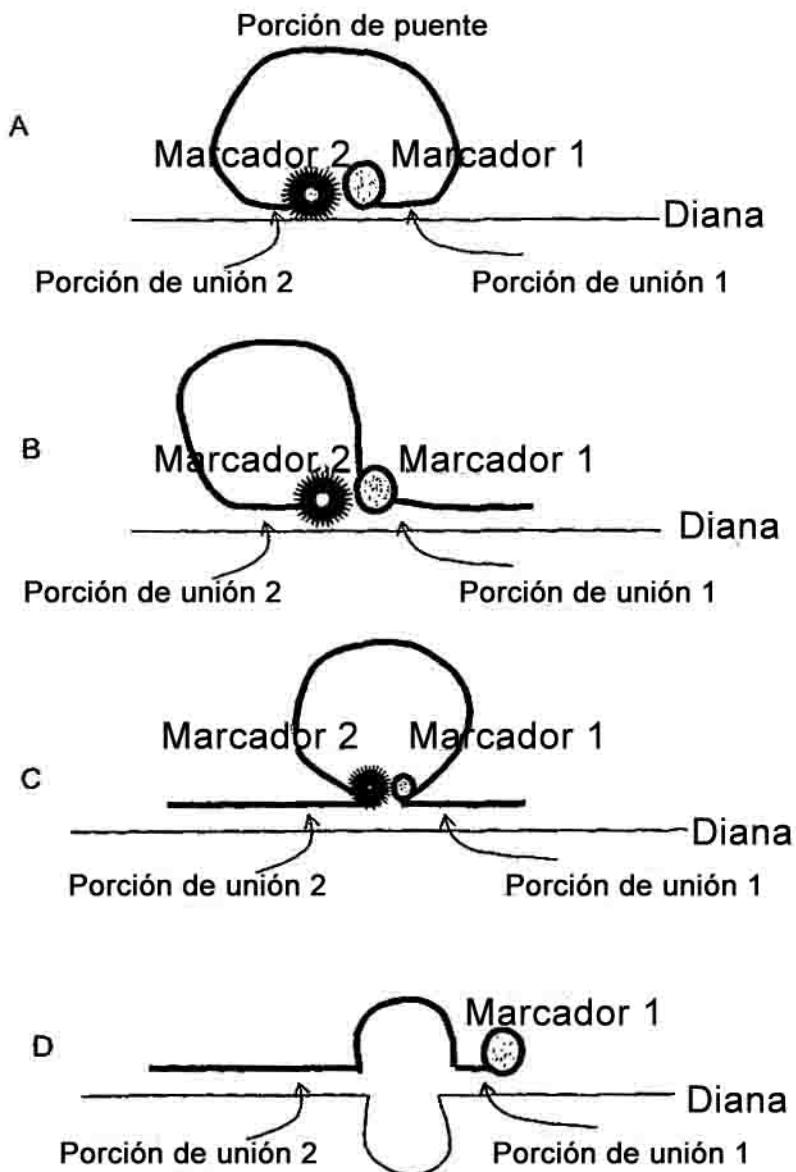


Fig.6 continuación

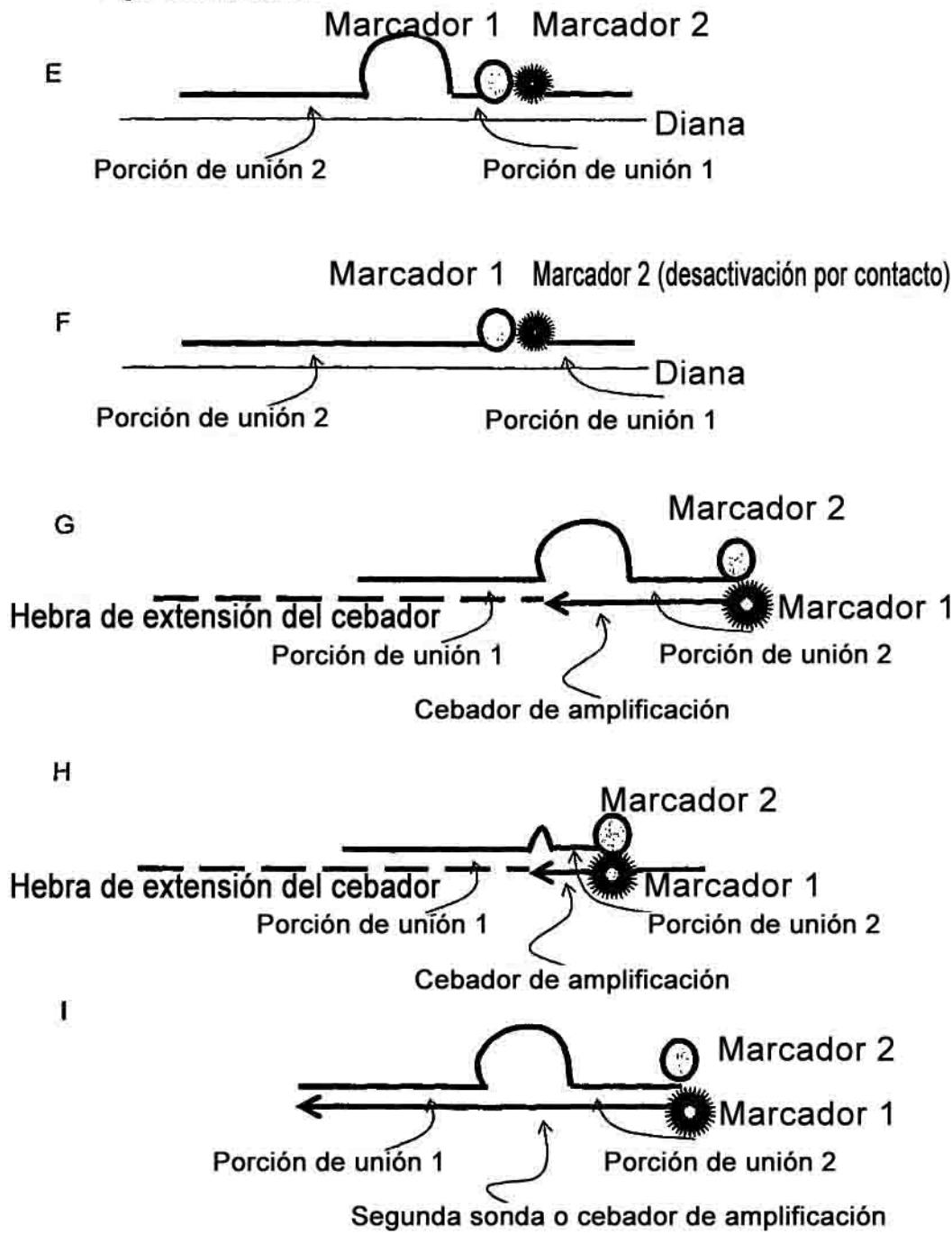


FIG. 7

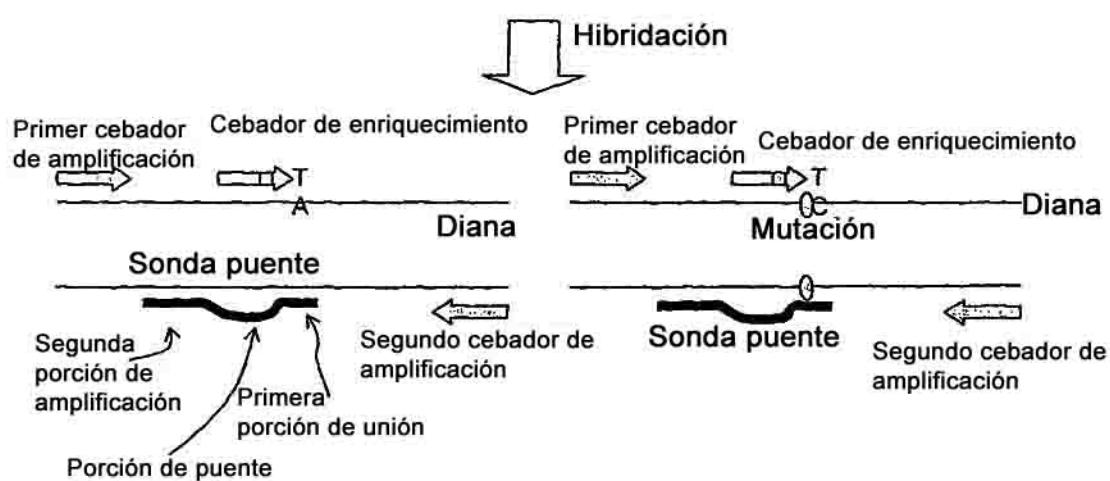


Fig. 8

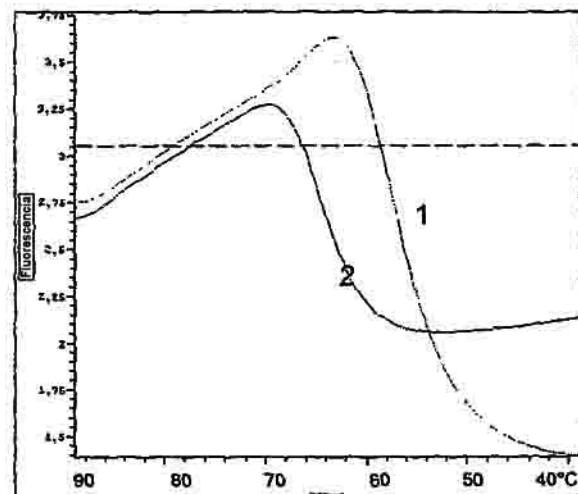
Exploración de mutaciones desconocidas

Sonda puente



Fig. 9

A



B

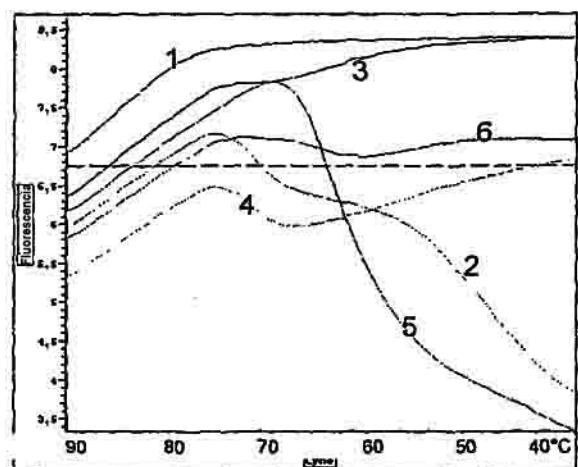
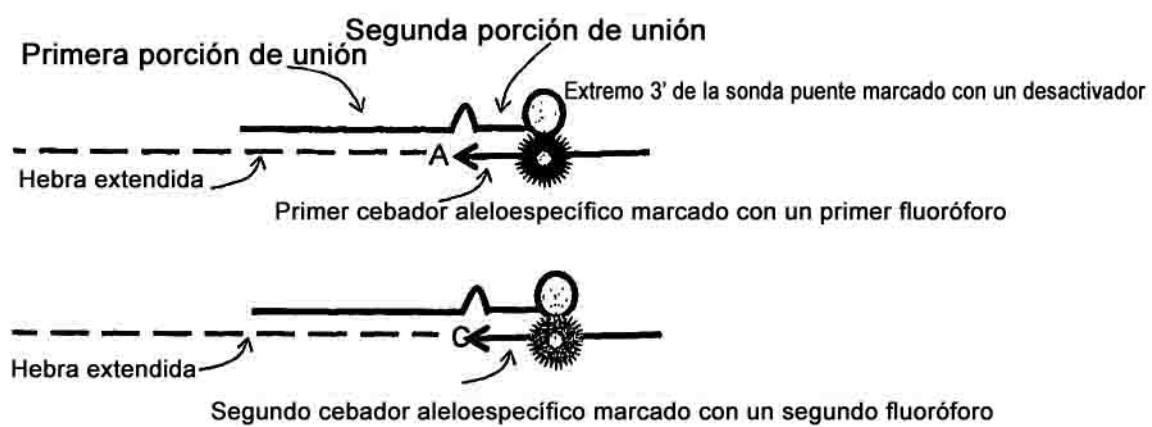


Fig. 10

A Uso de una sonda puente para la detección de un SNP o una mutación



B



Fig. 11

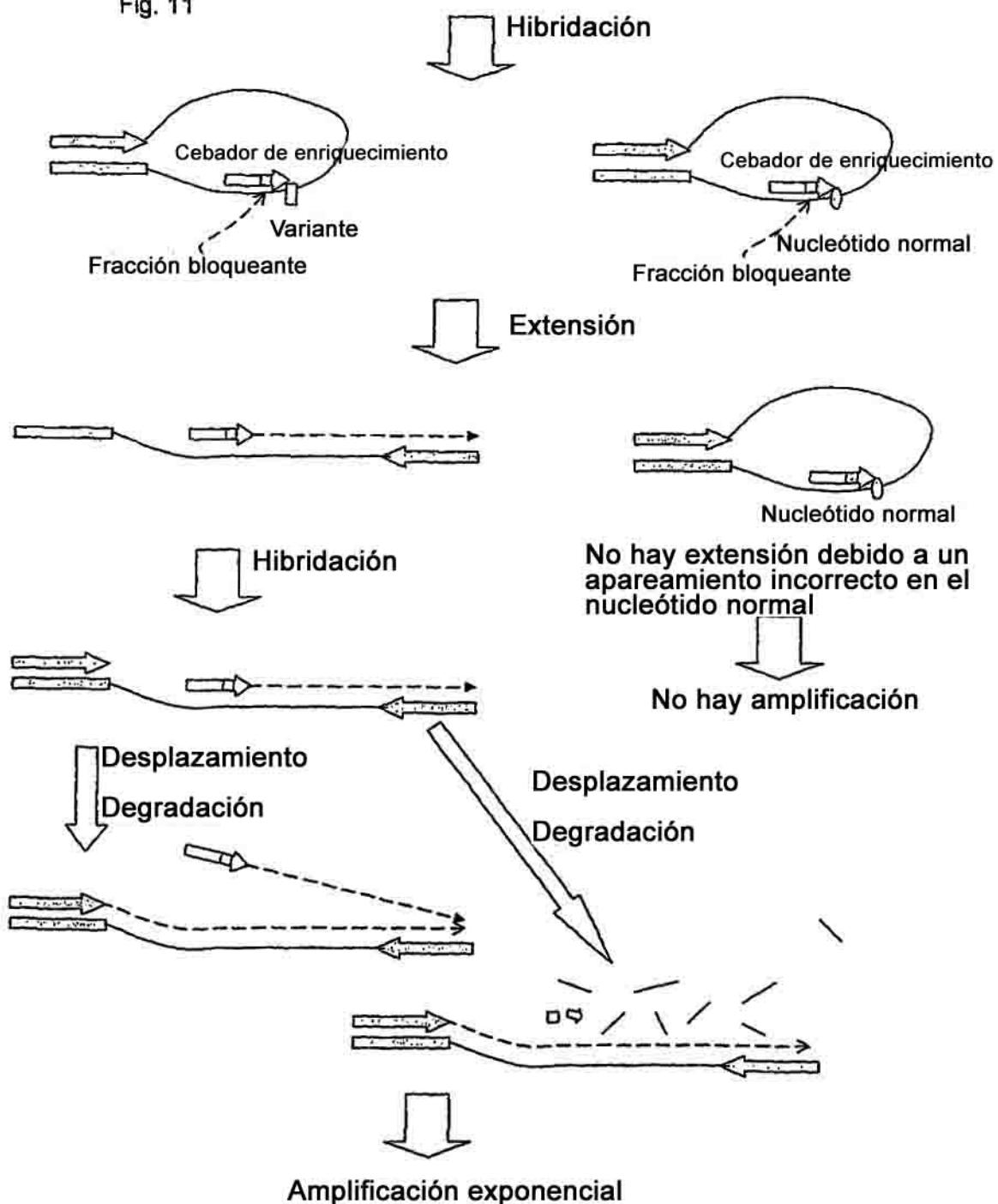


Fig. 12

