(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
19 de enero de 2017 (19.01.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/009515 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/070537

(22) Fecha de presentación internacional:
15 de julio de 2016 (15.07.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 201531047 16 de julio de 2015 (16.07.2015) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA** [ES/ES]; Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia (ES).

(72) Inventores: **MAQUIEIRA CATALA, Ángel**; Universitat Politècnica De València, Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, 46022 Valencia (ES). **NIÑOLES RODENES, Regina**; Universitat Politècnica De València, Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, 46022 Valencia (ES). **TORTAJADA GENARO, Luis Antonio**; Universitat Politècnica De València, Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, 46022 Valencia (ES). **MENA MOLLÁ, Salvador**; Universitat Politècnica De València, Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, 46022 Valencia (ES). **HEVIA MARÍN, Elizabeth Mildred**; Universitat Politècnica De València, Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, 46022 Valencia (ES). **MORAIS EZQUERRO, Sergi Beñat**; Universitat Politècnica De València, Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, 46022 Valencia (ES). **PUCHADES PLA, Rosa**; Universitat Politècnica De València, Ctro. Apoyo a la Innovación, la, Investigación y la Transferencia de Tecnología, CTT, Edf. 6G, 46022 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

WO 2017/009515 A1

(54) **Title**: METHOD FOR SIMULTANEOUS GENOTYPING OF POLYMORPHISMS AND/OR MUTATIONS

(54) **Título** : MÉTODO DE GENOTIPADO SIMULTÁNEO DE POLIMORFISMOS Y/O MUTACIONES

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for allelic discrimination for the detection of genetic polymorphisms and/or mutations, especially polymorphism of a single nucleotide, which comprises an allele-specific ligation, subsequent amplification with universal primers, hybridisation with probes anchored to a surface, preferably the surface of an optical disk, and the detection of the polymorphisms and/or mutations, preferably by means of an optical disk reader.

(57) **Resumen**: La presente invención se refiere a un método de discriminación alélica para la detección de polimorfismos genéticos y/o mutaciones,especialmente polimorfismo de un único nucleótido, que comprende una ligación alelo-específica,posterior amplificación con cebadores universales, hibridación con sondas ancladas sobre una superficie, preferiblemente la superficie de un disco óptico, y la detección de los polimorfismos y/o mutaciones, preferiblemente mediante un lector de disco óptico.

Método de genotipado simultáneo de polimorfismos y/o mutaciones

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un método de genotipado de polimorfismos, preferiblemente polimorfismos de un único nucleótido, u otro tipo de mutaciones que comprende una etapa de ligación alelo-específica, una amplificación con cebadores universales, una hibridación con sondas ancladas a un soporte y la detección de los productos formados específicos de dichos polimorfismos y/o mutaciones. La presente invención se puede encuadrar en el ámbito de la biomedicina y de la industria agroalimentaria.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) son mutaciones puntuales en el genoma, de modo que en una misma posición del ADN genómico existen diferentes variantes denominadas alelos y la abundancia del alelo menos frecuente es igual o mayor que el 1%. Los SNPs situados en regiones codificantes del genoma pueden alterar la estructura y función de las proteínas, lo que puede traducirse en cambios a nivel fenotípico. Numerosos estudios han establecido asociaciones entre la presencia de un determinado alelo y el fenotipo observado. Por tanto, los SNPs tienen importantes aplicaciones como marcadores, entre las que destacan las biomédicas: empleo con fines diagnósticos, para establecer el riesgo de un individuo a padecer una enfermedad, o en farmacogenética.

En la actualidad hay disponibles diversas metodologías de genotipado de polimorfismos y otras mutaciones que se basan en diferentes reacciones de discriminación alélicas tales como la hibridación alelo-específica (ej. Genechips® de Affymetrix) o la extensión de cebadores y posterior ligación (ej. Goldengate® de Illumina®). No obstante, existe una demanda de nuevas tecnologías que superen a las ya desarrolladas en:

-Escalabilidad, es decir, el número de polimorfismos interrogados debe de adaptarse a las necesidades de cada problema genético concreto.

-Capacidad de multiplexado, suficiente (10-100 SNPs) para que se puedan sacar conclusiones clínicas a partir de los resultados obtenidos.

-Método versátil, que pueda ser empleada con diferentes fines sin necesidad cambios importantes.
-Plataforma de detección portátil, de fácil manejo y más simple, que permita hacer uso de la tecnología en el lugar de interés ("Point of Care") y no únicamente en laboratorios bien dotados.
-Protocolo de trabajo corto, que pueda llevarse a cabo en una jornada laboral o menos.

En la actualidad no se dispone de una herramienta que comprenda todas las características anteriormente señaladas.

Entre los métodos que permiten la detección de SNPs, serían por ejemplo los descritos en US20030215825. Esta aproximación requiere el empleo de sondas específicas lo que presenta desventajas como la posible reactividad cruzada o el multiplexado limitado, por tener que emplear condiciones de hibridación comunes entre ellas. Además, se limita exclusivamente al empleo de partículas como marcadores para la detección. US2012252700 incluye una amplificación y posterior ligación alelo-específica, siendo la capacidad de multiplexado de la técnica de aproximadamente entre 3 y 20 SNPs. US20120270272 describe la metodología de discriminación basada en ligación alelo-específica y posterior amplificación por PCR universal utilizando oligonucleótidos específicos modificados con un grupo tiofosfato o azúcares y preferentemente ligasas termoestables. Esta metodología utiliza ligasas termoestables que no pueden ser inactivadas por un tratamiento térmico posterior (ligasas *Taq* o de *Pyrococcus*), por lo que durante la amplificación continúan los eventos de ligación y, en consecuencia, alterando la formación de productos de los diferentes SNPs.

Entre las técnicas versátiles y portables por ahora conocidas para el análisis de ácidos nucleicos se encuentra, por ejemplo, el empleo de discos ópticos como soporte para anclar biomoléculas y de lectores/grabadores de discos como detectores para estudiar diferentes biointeracciones (por ejemplo EP1324042, ES2304093A1, Santiago *et al.* (2014), *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, p. 273–281). Se han descrito técnicas de discriminación de SNPs mediante hibridación alelo-específica sobre discos ópticos, donde la hibridación se realiza generalmente con oligonucleótidos sintéticos, por ejemplo, Morais *et al.* (2006) *Chemical Communications*, 22, p. 2368-2370 (sólo un

SNP), Bañuls *et al.* (2008) *Bioconjugate Chemistry*, 19, (3), p. 665-672 y Yu *et al.* (2013) Acc. Chem. Res., 46 (2), p. 258–268. Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado que esta técnica permita el genotipado masivo de SNPs. La principal causa es que cada polimorfismo, debido a su propia naturaleza y a los nucleótidos de su entorno, requiere unas condiciones específicas para su correcta discriminación. Por ello, establecer unas condiciones que permitan diferenciar simultáneamente un gran número de SNPs mediante este método resulta muy complejo.

Por lo tanto, se hace necesario un método robusto para la detección simultánea de SNPs u otras mutaciones, con capacidad de multiplexado suficientemente elevada, escalable, más simple y con un protocolo de trabajo corto.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se ha combinado un método de discriminación alélica, basado en ligación alelo-específica, y posterior amplificación con cebadores universales, con una detección por hibridación con sondas ancladas sobre una superficie, preferiblemente de un disco óptico bien sea CD, DVD, Blu-ray, etc. y utilizando un lector/grabador de discos ópticos. Esta aproximación preferente hace que la metodología presentada aúne la alta fidelidad y la capacidad de multiplexado de la discriminación por ligación y la amplificación-hibridación con cebadores y sondas universales, con las características propias de la detección basada en la tecnología de discos ópticos, tales como portabilidad, facilidad de manejo y bajo coste. Así, esta invención aporta un sistema robusto, analíticamente poderoso, fiable y económicamente competitivo de genotipado, que puede ser aplicado a gran escala en centros de salud, industrias, laboratorios o en situaciones de emergencia o críticas. El método de la presente invención se enmarca dentro de las metodologías de genotipado de polimorfismos u otras mutaciones, permitiendo un multiplexado suficiente para aplicarse efectivamente al ámbito clínico (por ejemplo en medicina personalizada) y el agroalimentario (por ejemplo para la autenticación de alimentos, tanto animales como vegetales), especialmente, y es fácil de ubicar en los lugares de interés (POC, “Point of care”). El método descrito es, por tanto, una clara alternativa a los métodos más largos y excesivamente caros, disponibles actualmente a nivel comercial para el genotipado de un número medio de mutaciones.

En la presente invención el orden y el modo en que se realizan cada uno de los pasos del método tienen efecto sinérgico. En la presente invención la amplificación es una etapa clave y es posterior (a diferencia de la mayoría de técnicas basadas en la ligación) al paso de la ligación, que discrimina las diferentes variantes genéticas de los polimorfismos estudiados. Es decir, sólo se amplifican los productos alelo-específicos. Esto redunda en una mejor selectividad y un menor tiempo de análisis

El método de la presente invención también puede ser útil en el ámbito medioambiental (por ejemplo para la identificación de especies animales o vegetales) y en el forense (para identificación de individuos), entre otros.

La presente invención describe un método para el genotipado simultáneo de mutaciones, preferiblemente polimorfismos genéticos, especialmente polimorfismos de un único nucleótido (o SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*), también llamados polimorfismos de nucleótido simple.

El término "polimorfismo genético" se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de la cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) que tiene al menos una frecuencia del 1% en los individuos de una población. Los polimorfismos genéticos pueden ser variaciones de uno o varios nucleótidos. Particularmente, los polimorfismos de un solo nucleótido generalmente dan lugar a dos alelos. El genotipado de SNPs proporciona información sobre la variación de un solo polimorfismo o la información de un haplotipo (SNP etiquetas o "tagSNP").

"Haplotipo" es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son trasmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci. En la presente invención nos referimos a "haplotipo" como un conjunto de polimorfismos (SNPs) que se heredan en bloque con unas medidas de desequilibrio de ligamiento $r2 \geq 0,8$ y que se identifican mediante el genotipado de uno de los polimorfismos incluidos en dicho haplotipo. Por lo tanto, el método de la presente invención permite la detección de un determinado polimorfismo y/o haplotipo en un individuo.

La presente invención emplea una técnica de discriminación alélica que comprende una ligación alelo-específica (mediante la acción de una enzima ligasa con capacidad para unir los oligonucleótidos específicamente diseñados para la discriminación de cada SNP a detectar) seguida de una amplificación con cebadores universales, hibridación con sondas ancladas en una superficie y la detección. En una realización particular, el soporte analítico es un disco óptico (ya sea en formato CD, DVD, Blu-Ray, discos de grabado termocrómico, etc.) y el detector es un lector/grabador de discos ópticos. Permite formalizar un desarrollo que reduce los tiempos de análisis, abarata y simplifica el ensayo, al mismo tiempo que lo convierte en una metodología fácilmente aplicable *in situ*.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección de al menos un polimorfismo u otra mutación, preferiblemente polimorfismo de un único nucleótido (SNP), en una muestra aislada de un sujeto que comprende (a partir de ahora el "método de la invención") los siguientes pasos:

a. ligación alelo-específica entre oligonucleótidos en disolución o en fase sólida;
b. amplificación de los productos de ligación obtenido en el paso (a), donde la amplificación se realiza utilizando al menos un cebador universal en disolución o en fase sólida, preferiblemente con una única pareja de cebadores universales;
c. hibridación del producto amplificado obtenido en el paso (b) con sondas, donde las sondas están fijadas en una superficie; y
d. detección del polimorfismo o mutación del producto obtenido en el paso (c).

El método de la invención permite detectar simultáneamente varios polimorfismos u otras mutaciones, preferiblemente polimorfismos de un único nucleótido (SNP).

En una realización preferida del método de la presente invención, los polimorfismos u otras mutaciones detectados simultáneamente son entre 5 y 200. En una realización más particular son más de 15 y menos de 100, los SNPs y/o mutaciones detectados. En una realización más particular son más de 20 los SNPs y/o mutaciones detectados, más preferiblemente de entre 30 y 100, es decir: 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62,

63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

En el método de la presente invención, la ligación (discriminación alélica) del paso (a) se efectúa a través de una enzima ligasa, preferentemente termoestable, que enlaza oligonucleótidos diseñados *ad hoc* para cada gen y polimorfismo.

El término "ligasa termoestable" se refiere a que la enzima mantiene su actividad (ligación) incluso sometida a una temperatura elevada, por ejemplo, típicamente, una temperatura superior a 45 ºC, y más preferiblemente de, al menos 60 ºC. Ejemplos de ligasas termoestables pueden ser (pero sin limitarse): ligasas de *Thermus aquaticus*, *Thermus themophilus* o de *Pyrococcus spp*. Enzimas no termoestables como la T4 ligasa o ligasas de *E. coli*, podrían utilizarse, pero la tasa de error cometido aumentaría. Por lo tanto, las ligasas termoestables son la opción preferente porque al actuar a temperaturas elevadas (por ejemplo entre 60 y 65ºC), se mantiene la alta fiabilidad del ensayo, reduciéndose la hibridación inespecífica con el ADN molde y, por tanto, la ligación no deseada. En una realización particular, la ligación se realiza a una temperatura de entre 60 a 65 ºC (60, 61, 62, 63, 64 o 65 ºC).

Preferiblemente, se utilizarán enzimas ligasas termoestables con tiempos de reacción cortos (5-15 minutos) y que puedan ser inactivadas previamente a la amplificación, por ejemplo, mediante un tratamiento térmico o la adición de un bloqueante, de modo que se evite que continúen los eventos de ligación durante esta etapa. Un ejemplo sería la "Ligasa 65" (Holland HRC), que es termoestable y puede ser inactivada mediante un tratamiento (por ejemplo de 5 minutos a 98 ºC). Por este motivo, en una realización particular, previo a la amplificación, paso (b), se inactiva la ligasa del paso (a) durante 3-10 minutos (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos), preferiblemente de 5 minutos a 95-99 ºC (95, 96, 97, 98 o 99 ºC), preferiblemente a 98 ºC.

En una realización particular, la ligación se realiza en un tiempo entre 5 a 15 minutos a una temperatura de entre 60 a 65 ºC y posteriormente se inactiva durante 3-10 minutos, preferiblemente durante 5 minutos a 95-99 ºC, preferiblemente 98ºC.

Para cada gen o polimorfismo, en la etapa de ligación se utilizan oligonucleótidos discriminantes (OD), uno para cada variante alélica, y un oligonucleótido común (OC)

para todas las variantes. En una realización preferida, en caso de dos variantes alélicas, cada ligación del paso (a) se realiza mediante con dos oligonucleótidos discriminantes (por ejemplo, denominados como OD-A y OD-B) y un oligonucleótido común.

En el caso de SNPs, los oligonucleótidos utilizados el paso (a) poseen las siguientes características. Los oligonucleótidos ODs son complementarios al ADN genómico y se diferencian entre sí en el nucleótido de uno de sus extremos, que es específico para cada alelo. Los oligonucleótidos ODs pueden poseer desapareamientos con la región diana del ADN del sujeto para favorecer la correcta discriminación. Además, los oligonucleótidos ODs para un determinado polimorfismo pueden ser iguales o diferentes en tamaño. El oligonucleótido común (OC) es complementario al ADN genómico situado inmediatamente a continuación del SNP y en la misma hebra que los ODs. Los oligonucleótidos ODs o el oligonucleótido OC están fosforilados en un extremo para permitir la ligación. En una realización particular, los oligonucleótidos OD son complementarios al ADN genómico anterior al polimorfismo y tienen el nucleótido específico para cada alelo en el extremo 3' y el oligonucleótido OC está fosforilado en el extremo 5'.

Además, los oligonucleótidos pueden poseer modificaciones que mejoren la selectividad del proceso y/o anclaje, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA, *locked nucleic acids*), o estar modificados (en posición 5', posición 3' y/o nucleótidos internos) con estructuras como biotina, digoxigenina, azúcares, partículas y/o nanotubos.

Los oligonucleótidos empleados (OD y/o OC), además de la región complementaria al ADN genómico en estudio, poseen colas, secuencias genéricas no presentes en el genoma diana, que permiten la amplificación-hibridación en formato universal. Las colas incluidas en los OD (por ejemplo, OD-A, OD-B) y OC para la amplificación universal, pueden ser todas iguales, únicamente dos iguales o todas diferentes entre sí, pero son las mismas para todos los polimorfismos y/o alelos analizados. Particularmente, para lograr la amplificación universal, las secuencias de las colas utilizadas pueden ser, pero sin limitarse, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. En el caso de hibridación con sondas universales ancladas sobre el soporte, paso

(c), el oligonucleótido OD, OC, o ambos además poseen una cola genérica pero diferente para cada polimorfismo y/o alelo.

El tamaño de los oligonucleótidos puede ser cualquiera, preferiblemente entre 16 a 100 nucleótidos, más preferiblemente entre 40 y 70 nucleótidos (es decir, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70).

La reacción de discriminación alélica se inicia con la hibridación de los oligonucleótidos específicos (ODs y OC) con el ADN molde (Figura 1), y a continuación la enzima ligasa une los fragmentos adyacentes. La ligación tendrá lugar únicamente, o prioritariamente, cuando la complementariedad del OD, respecto al nucleótido correspondiente al alelo en estudio, sea perfecta; de modo que se obtendrán únicamente, o prioritariamente, los productos correspondientes al alelo/s propio/s del genoma de cada sujeto.

La etapa de ligación se puede llevar a cabo mediante una única reacción o mediante dos reacciones independientes de discriminación alélica, que difieren en los oligonucleótidos ODs empleados para cada SNP (Tabla 1). En el primer caso la mezcla de reacción contiene los oligonucleótidos OD (ejemplificados como OD-A, OD-B) y OC lo que permite formar simultáneamente los productos de ligación correspondientes a ambos alelos. En el segundo caso, la mezcla de reacción A contiene los oligonucleótidos OD-A y OC, y la mezcla de reacción B, los oligonucleótidos OD-B y OC. De este modo, cada reacción genera únicamente el producto de ligación específico para el alelo correspondiente a cada OD, si el ADN molde presenta dicha variante alélica.

Tabla 1: Productos de ligación formados en función de los oligonucleótidos añadidos a la mezcla de reacción y del genotipo del sujeto para el polimorfismo analizado. En este caso, el alelo A es el nativo y el alelo B es el mutante.

	Oligonucleótidos	Homocigoto nativo	Homocigoto mutante	Heterocigoto
Mezcla	OD-A OD-B OC	Producto nativo	Producto mutante	Ambos productos

Reacción A	OD-A OC	Producto nativo	No producto	Producto nativo
Reacción B	OD-B OC	No producto	Producto mutante	Producto mutante

En el método de la invención, la ligación del paso (a) puede ser realizada en disolución o en fase sólida, es decir, en la superficie de un soporte en contacto con la disolución (Figura 2). En este segundo caso, al menos uno de los oligonucleótidos implicados en la ligación está anclado en la superficie analítica y la ligación OD-OC da lugar al producto de ligación anclado a dicha superficie. El oligonucleótido a anclar puede estar modificado para permitir o favorecer la inmovilización. En una realización particular, las modificaciones comprenden la inclusión de grupos tiol, amino, biotina, digoxigenina, partículas o azúcares.

El anclaje de los oligonucleótidos se realiza sobre toda la superficie o en regiones específicas, preferentemente, pero sin limitarse, en formato de micromatriz. Los métodos de anclaje comprenden adsorción directa, adsorción indirecta, afinidad (ej. par estreptavidina/biotina, neutravidina/biotina, antidigoxigenina/digoxigenina, lectinas/azúcar, etc.), o covalente, entre otros modos (Figura 3). Las reacciones de inmovilización tipo covalente que pueden ser compatibles incluyen reacciones vía grupos tiol, amino, entre otros, pudiendo incluir grupos espaciadores superficie-sonda, como por ejemplo, una cola de varios nucleótidos de timina o adenina.

El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, paso (b), se refiere al aumento del número de copias de una región del ácido nucleico molde (Figura 4). La amplificación se realiza con los métodos conocidos por el experto en la materia.

El paso (b) de amplificación del método de la invención se puede realizar mediante reacción en cadena de la polimerasa [PCR (*polymerase chain reaction*)] o reacciones de amplificación isoterma, tales como amplificación RPA (amplificación recombinasa polimerasa, *recombinase polymerase amplification*) o SDA (amplificación por desplazamiento de hebra, *strand displacement amplification*), entre otras. En cualquier caso, la amplificación se lleva a cabo empleando cebadores universales.

El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde, es decir, con el producto de la ligación obtenido en el paso (a) del método de la presente invención.

El término “cebador universal”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a aquellos oligonucleótidos que no reconocen ninguna parte del genoma diana y son empleados para amplificar todos los productos de ligación al mismo tiempo, gracias a la incorporación previa de las colas pertinentes.

La amplificación ocurre para todos los genes, polimorfismos u otras mutaciones de forma simultánea, empleando cebadores universales que reconocen las colas presentes en los OD y OC. Preferiblemente, el número de cebadores empleados es entre 1 y 3, dependiendo del tipo de amplificación y de las secuencias de las colas presentes en los oligonucleótidos ligados. El tamaño de los cebadores puede ser cualquiera, preferiblemente entre 15 a 30 nucleótidos, más preferiblemente entre 18 y 24 (18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24). Las secuencias de los cebadores universales son las mismas o complementarias (total o parcialmente) a las secuencias de las colas presentes en los oligonucleótidos OD y/o OC. Particularmente, los cebadores empleados en la presente invención, pero sin limitarse, presentan las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, 2 y 4.

En una realización particular de la invención, cuando la ligación, paso (a), tiene lugar mediante dos reacciones independientes de discriminación alélica (A y B), se emplea una única pareja de cebadores universales (delantero y trasero) para cada reacción. Particularmente, las parejas de cebadores empleadas en la presente invención pueden tener, pero sin limitarse, las siguientes secuencias: la pareja SEQ ID NO: 1 y 4 o la pareja SEQ ID NO: 2 y 4.

Asimismo, durante este paso (b) tiene preferiblemente lugar el marcaje de los productos ligados empleando cebadores marcados y/o nucleótidos funcionalizados, conocidos por cualquier experto en la materia. El término “nucleótido” incluye desoxirribonucleósidos trifosfato como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos, tales como LNA. Una alternativa de marcaje es realizar la modificación post-amplificación y/o post-

hibridación de los productos formados, utilizando oligonucleótidos y/o nucleótidos funcionalizados. Marcadores o etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas. En una realización preferente, los marcadores comprenden antígenos, partículas, fluoróforos o similares, unidos a los cebadores o como grupos funcionales de los nucleótidos.

La amplificación se realiza preferentemente en disolución (Figura 5). En este caso, los productos obtenidos tras la amplificación interaccionan posteriormente con las sondas inmovilizadas en la superficie, paso (c). Concretamente, se produce un reconocimiento de hibridación del producto amplificado con la sonda anclada.

En una realización particular de la presente invención, la amplificación se lleva a cabo en fase sólida (Figura 5). El término "amplificación en fase sólida" implica la inmovilización de al menos uno de los cebadores sobre la superficie sólida, ocurriendo la reacción de amplificación en la interfaz disolución-sólido y originando un producto anclado a dicha superficie. De este modo, los pasos (b) y (c) quedan integrados. En esta realización, los oligonucleótidos OD, OC, ambos, o regiones específicas para cada gen y polimorfismo se inmovilizan en una superficie para actuar como cebadores. Además, se puede añadir al menos un cebador universal a la disolución, en contacto con la superficie para permitir la amplificación o aumentar su rendimiento o especificidad. Particularmente, las secuencias de los cebadores universales empleados podría ser, pero sin limitarse, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

Para llevar a cabo la amplificación en la realización preferida basada en la ligación en fase sólida, al menos uno de los cebadores universales está anclado o se añade a la disolución, en contacto con la superficie, y el producto de ligación (anclado en la superficie) actúa como molde de la amplificación (Figura 5). En este caso, al integrarse las etapas de amplificación e hibridación, se genera un producto final anclado a la superficie, y si se utilizan cebadores o nucleótidos marcados, el producto resultante también está marcado. Ejemplos de superficies incluirían derivados del silicio, polímeros naturales o sintéticos, entre otros.

El término “hibridación”, tal y como se utiliza en la presente descripción del paso (c), se refiere al apareamiento de dos moléculas complementarias de ácido nucleico (de ADN y/o ARN) de cadena simple para dar lugar a una molécula de doble cadena (Figura 6).

La hibridación se produce en condiciones controladas de pH, contenido salino, astringencia, temperatura y tiempo. Los componentes de la mezcla de hibridación comprenden, por ejemplo, citrato sódico salino (SSC) a pH 7, formamida, *Denhardt's*, etc. Variaciones en las concentraciones de estos componentes influyen en la especificidad y selectividad de la hibridación, tal y como es conocido por el experto en la materia. La temperatura de hibridación puede ser, por ejemplo, de entre 35 y 45ºC (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45ºC) y el tiempo de hibridación es, preferiblemente, entre 30 minutos y 2 horas (por ejemplo, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 o120 minutos).

Una de las moléculas participantes es el producto de ligación o de amplificación y se encuentra en disolución. Las otras moléculas que participan en la hibridación, denominadas “sondas”, se encuentran ancladas sobre una superficie (o soporte, o soporte sólido o superficie sólida). En una realización preferida, las sondas en el paso (c) de hibridación son ácidos nucleicos y tienen un tamaño de entre 20 y 30 nucleótidos. En otra realización particular las sondas pueden ser aptámeros o ácidos nucleicos modificados, tales como LNAs. El anclaje de las sondas se realiza sobre toda la superficie o en regiones específicas, preferentemente, pero sin limitarse, en formato de micromatriz. El oligonucleótido a anclar puede estar modificado para permitir la inmovilización. En una realización particular, las modificaciones comprenden la inclusión de grupos tiol, amino, biotina, digoxigenina, partículas o azúcares. También pueden incluir modificaciones que mejoren la selectividad del proceso, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA, *locked nucleic acids*). Las sondas son inmovilizadas sobre la superficie mediante adsorción directa, adsorción indirecta, afinidad (ej. par estreptavidina/biotina, neutravidina/biotina, antidigoxigenina/ digoxigenina, lectinas/azúcar, etc.), o por anclaje covalente, entre otros modos de fijación de sondas (Figura 3). Las reacciones de inmovilización tipo covalente que pueden ser compatibles incluyen reacciones vía grupos tiol, amino, entre otros, pudiendo incluir grupos espaciadores superficie-sonda, como por ejemplo, una cola de varios nucleótidos de timina o adenina.

Las sondas pueden tener una secuencia específica del gen en cuestión, o ser sondas genéricas. Las sondas genéricas son aquellas que no hibridan con el genoma diana, pero reconocen a las colas presentes en los oligonucleótidos empleados, preferentemente en aquellos empleados en la ligación (OD, OC o ambos). Con esta opción, las sondas son diseñadas para que hibriden con los oligonucleótidos diana en condiciones de hibridación sustancialmente similares. Por lo tanto, esta aproximación aporta versatilidad a la plataforma de genotipado, ya que permite mantener las mismas sondas y condiciones de hibridación para cualquier conjunto de polimorfismos o mutaciones en estudio.

En una realización preferida, las sondas en el paso (c) de hibridación tienen un tamaño de entre 20 y 30 nucleótidos, preferiblemente de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

En el paso (c) del método de genotipado propuesto, cuando la amplificación tiene lugar en disolución, los productos generados en la amplificación, paso (b), son reconocidos específicamente por un conjunto de sondas ancladas sobre la superficie. En las realizaciones particulares basadas en la ligación en fase sólida y la amplificación en fase sólida, este paso (c) ocurre de forma integrada al paso (b) del método, reduciendo los tiempos de ensayo y la manipulación requerida.

El marcaje de los productos hibridados o amplificados en la superficie también puede realizarse, incluyendo una etapa previa, simultánea o posterior de hibridación, ligación o extensión, entre otras. En una opción preferida, se incorpora un paso de hibridación adicional para el marcaje de los productos formados, utilizando un oligonucleótido complementario al producto y que contiene un marcador como biotina o digoxigenina, entre otros.

En otra realización preferida del método de la invención, los oligonucleótidos, sondas o cebadores, anclados sobre la superficie pueden ser específicos o genéricos o comprender una región específica y una genérica.

En la presente invención los términos “superficie”, “soporte”, “soporte sólido” o “superficie sólida” se utilizan indistintamente. En la presente invención los términos “anclado”, “inmovilizado” y “fijado” se utilizan indistintamente.

El soporte para realizar el genotipado de polimorfismos y/o mutaciones (en los pasos (a), (b) y/o (c)) puede ser cualquier superficie (láminas, chips o partículas) de un material polimérico, derivado del silicio, etc. siempre que permita la inmovilización de las sondas y la detección del producto formado (paso (d)). El número de micromatrices, réplicas y su configuración espacial en el ensayo puede ser variado. Las dimensiones de las regiones de interacción pueden ser del orden de nanómetros o superiores.

En una realización preferida, el soporte es la superficie de un disco óptico o disco compacto y en el paso (d) la detección se realiza utilizando lectores de disco óptico o disco compacto.

Por "disco óptico" o "disco compacto" se entiende un medio de almacenamiento de datos de tipo óptico, que consiste esencialmente en un disco en el cual la información se codifica, guarda y almacena en los surcos microscópicos generados en una de las capas planas que lo componen. Cualquier tipo o morfología de la información (texto, imagen, audio, vídeo, etc.) puede ser codificada en formato digital y almacenada en este tipo de soportes. Se pueden seleccionar, sin limitarse, a CD (*Compact Disc* o disco compacto), DVD (*Digital Versatile Disc* o *Digital Video Disc*), Blu-ray, entre otros. El disco utilizado puede ser cualquier disco de un estándar comercial o no, que se pueda leer con un lector/grabador que preferiblemente utilice un cabezal láser para leer/grabar. El disco a utilizar puede estar sin modificar o incluir alguna etapa de pretratamiento, tales como lavado, activación, recubrimiento, etc. También incluyen discos que incorporen capas adicionales, por ejemplo microfluídicas. El uso de este tipo de superficies proporciona a la presente invención una superficie de trabajo de altas prestaciones (robusta, versátil, económica, etc.) y un método sencillo y rápido, además de barato y fácil de implementar en el lugar requerido. En una realización particular, el soporte son discos sin modificar o sus variantes modificadas que preferiblemente comprenden superficies tratadas o discos con un mayor número de capas (discos ópticos multicapa).

El anclaje de los oligonucleótidos puede realizarse directamente sobre la superficie del disco o sobre una capa polimérica añadida al disco (Figura 3). Para lograr un buen rendimiento de inmovilización de oligonucleótidos, el disco óptico puede ser pretratado

con tratamientos que no dañen sus propiedades ópticas, como por ejemplo disoluciones de lavado, adición de capas poliméricas, estructurado o microestructurado, irradiado o sometido a ataque con plasma, entre otros conocidos por un experto en la materia. Los oligonucleótidos pueden estar dispuestos en el disco en formato de micromatriz, pudiendo incluir controles positivos y negativos (Figura 7).

En el paso (d) del método de la invención, se produce la detección del SNP o mutación gracias al marcaje realizado, mediante observación o con un detector. Este proceso puede ser directo si las etapas anteriores del método han originado un producto detectable, o incluir varias etapas de revelado o amplificación para generar el producto detectable y/o aumentar la cantidad de producto detectable. El "producto detectable", tal como se entiende en la presente descripción, es una especie que origina una señal observable o una respuesta en el detector. Estos productos comprenden compuestos con grupos redox, fluorescentes o luminiscentes, sólidos, precipitados, partículas, depósitos metalográficos, enzimáticos o compuestos coloreados, entre otros. Ejemplos de procesos de detección comprenden la medida de la emisión, absorción, transmisión, conductividad o variaciones de voltaje, entre otros, utilizando equipos como espectrofotómetros, fluorímetros, conductímetros o voltamperímetros, entre otros.

En la presente invención, la detección se realiza preferiblemente mediante la medida de la interacción con un haz láser emitido por un lector de discos ópticos (lector de CD, DVD, Blu-Ray, por ejemplo). Se entiende por "lector de disco óptico", el dispositivo capaz de obtener la información almacenada en dicho disco utilizando un láser que le permite leer dicha información. En esta categoría, se incluyen los lectores/grabadores de CDs, DVDs, Blu-Rays y cualquier dispositivo capaz de escanear la superficie del disco con un haz láser.

Para la detección mediante un lector de discos ópticos, se necesita la formación de un producto o depósito capaz de interaccionar con la luz (absorber, dispersar, etc.) modificando la intensidad del haz láser (Figura 8). Estos productos comprenden sólidos, precipitados, depósitos metalográficos, enzimáticos o compuestos coloreados, entre otros. Una realización preferida es el marcaje del producto con un antígeno y posterior incubación con anticuerpos que reconocen dicho antígeno y que están

conjugados a marcadores como enzimas, partículas, etc., dando lugar a la modificación de la intensidad del haz láser del lector de disco óptico.

El método permite el genotipado en una muestra aislada de un sujeto en estudio que comprende ADN. Por "muestra aislada" se entiende una parte o porción representativa extraída del sujeto. Por "sujeto" se entiende cualquier organismo (animal, vegetal, bacteriano, etc.) o mezcla de organismos o sus derivados, por ejemplo alimentos (en este caso el alimento comprende una porción del animal o vegetal del que deriva, por ejemplo tejidos, músculo, grasa, tendones en animales o partes del vegetal por ejemplo, raíces, hojas, inflorescencias o tallos). En la presente invención, el sujeto es, preferiblemente, un humano, hombre o mujer de cualquier edad, nacido o no nacido (ya que el método de la invención es de utilidad también en diagnóstico prenatal). En la presente invención el término "humano", "paciente" e "individuo" se utilizan indistintamente. En el caso de humanos o pacientes, la muestra (muestra biológica) se puede seleccionar de la lista que consiste en: sangre, suero, plasma, linfa, orina, saliva, lavado broncoalveolar, esputo, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, tejido, frotis bucal, secreción lacrimal u otros tejidos o fluidos. Preferiblemente, la muestra es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina. La extracción del ADN genómico de las muestras, se lleva a cabo por métodos convencionales o empleando kits comerciales. El ADN puede ser de un embrión o feto y la muestra puede ser una muestra materna, por ejemplo sangre, que comprenda el ADN del embrión o feto.

Por tanto, en la presente invención se ha desarrollado un método de genotipado simultáneo, económico, sensible y específico de polimorfismos y/o mutaciones, siendo especialmente adecuado para el genotipado de SNPs.

El método de la presente invención puede también comprender la detección de un control interno (o estándar), dicho control se puede añadir a la muestra a analizar y/o ser una región, polimorfismo o mutación del genoma del sujeto.

El método de la presente invención es útil para detectar enfermedades genéticas o cáncer, como herramienta en farmacogenética/farmacogenómica (para establecer la dosis del fármaco o el tipo de tratamiento específico para un paciente) y en otras aplicaciones clínicas. También es útil en los ámbitos agroalimentario (p. e.

autentificación de alimentos), medioambiental-biológico (p. e. identificación de especies animales o vegetales) y forense (p. e. identificación de restos humanos), entre otros.

La presente invención también se refiere a un kit (también puede ser un dispositivo) que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo el método de la presente invención. Preferiblemente, comprende una ligasa, al menos un cebador universal, al menos una sonda y una superficie de soporte, preferiblemente un disco óptico o disco compacto, como CD, DVD, Blu-Ray y similares, y un detector, preferiblemente, un lector de disco óptico o disco compacto. La presente invención también se refiere al uso del kit (o del dispositivo) para la realización del método de la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Esquema de la discriminación del polimorfismo mediante el uso de oligonucleótido discriminante (OD) y oligonucleótido común (OC). (I) Complementariedad total e (II) Complementariedad parcial.

FIG. 2 Reacción de ligación en disolución (I) y en fase sólida o en la superficie del disco (II). Oligonucleótido discriminante para la variante alélica A (OD-A) o B (OD-B) y oligonucleótido común (OC).

FIG. 3 Esquema de los modos de inmovilización de oligonucleótidos sobre la superficie analítica: (I) covalente directo, (II) adsorción indirecta o afinidad, (III) covalente indirecto o sobre capa adicional. (a) oligonucleótido con secuencia específica o genérica, (b) cola o espaciador, (c) molécula de anclaje, (d) capa polimérica, (e) superficie.

FIG. 4 Reacción de amplificación-marcaje de los productos de ligación. Oligonucleótido discriminante (OD) y oligonucleótido común (OC).

FIG. 5 Amplificación en disolución (I), amplificación en fase sólida (II) y amplificación del producto de ligación anclado (III): (a) Producto de ligación, (b) Cebador, (c) Producto de amplificación marcado, (d) Superficie, (e) Cebador anclado, (f) Producto de amplificación marcado e inmovilizado, (g) Producto de ligación anclado.

FIG. 6 Esquema de la hibridación de los productos de amplificación con las sondas inmovilizadas en la superficie. (I) Reconocimiento positivo y (II) ausencia de reconocimiento. (a) Superficie, (b) sondas ancladas en la superficie, (c) producto de amplificación marcado.

FIG. 7 Esquema de disposición de las sondas en formato de micromatriz sobre un disco óptico.

FIG. 8 (I) Principio de lectura por reflexión de los productos formados en la superficie del disco utilizando lectores/grabadores de discos compactos. (II) Registros de variación de la intensidad del haz en función de la posición en el disco. (a) Disco óptico, (b) lector, (c) haz de luz emitido, (d) haz de luz reflejado, (e) producto formado.
FIG. 9 Esquema del procedimiento ejemplo I para el genotipado de SNPs.

FIG. 10 Imágenes de resultados de los ensayos. Izquierda: Matriz de sondas ancladas sobre el DVD. Centro: Imagen resultante del ejemplo I para sondas del alelo 1(4 puntos/gen). Derecha: Imagen resultante del ensayo 1 para sondas del alelo 2 (4 puntos/gen). Los resultados de este ejemplo son: gen1:GG, gen2:CT, gen3:AG, gen4:CC, gen5:GG, gen6:CC, gen7:AA, gen8:TT, gen9:GG, gen10:AG, gen11:AA, gen12:CC, gen13:CT, gen14:CG, gen15:AG, gen16:CT, gen17:GG, gen18:AG, gen19:CG, gen20:CC, gen21:GG, gen22:CC, gen23:CC, gen24:TT. Control positivo: Sonda marcada con digoxigenina. Control negativo: Sonda que no es reconocida por ninguno de los productos de amplificación.

FIG. 11 Esquema del procedimiento del ejemplo II para el genotipado de SNPs.

FIG. 12 Imágenes de resultados del ejemplo II. Izquierda: Matriz de sondas ancladas sobre el DVD. Centro: Imagen resultante del ensayo 2 para sondas del alelo 1 (4 puntos/gen). Derecha: Imagen resultante del ensayo 2 para sondas del alelo 2 (4 puntos/gen). Los resultados de este ejemplo son: gen1:AG, gen2:TT, gen3:AG, gen4:GG, gen5:AA, gen6:GG, gen7:GG, gen8:CA, gen9:GG, gen10:GG, gen11:AA, gen12:CC, gen13:CG, gen14:AG, gen15:AA, gen16:CT, gen17:GG, gen18:CT. Control positivo: Sonda marcada con digoxigenina. Control negativo: Sonda que no es reconocida

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante ensayos realizados por los inventores, demostrando la viabilidad y la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: Genotipado de SNPs mediante ligación, amplificación por PCR e hibridación con sondas universales ancladas sobre disco óptico

La muestra de ADN se obtiene a partir de frotis bucal. Para cada muestra se llevan a cabo dos reacciones de discriminación alélica (A y B) que difieren en los oligonucleótidos discriminantes empleados para cada SNP. Se emplean discos DVD-R de 12 cm de diámetro como soporte de ensayo y un lector/grabador de DVDs como detector. El protocolo de ensayo comprende varias etapas (Figura 9).

En la discriminación alélica, se distinguen los siguientes pasos:

- Desnaturalización del ADN. Se añaden 10-100 ng de ADN genómico al tampón de reacción y se incuba a 95 ºC durante 5 min.
- Hibridación de los oligonucleótidos con el ADN molde. Para cada polimorfismo se añade un oligonucleótido OD, con una secuencia alelo-específica y una cola para la amplificación universal, SEQ ID NO: 6, 7, 10, 11, 14, 15, 18, 19, 22, 23, 26, 27, 30, 31, 34, 35, 38, 39, 42, 43, 46, 47, 50, 51, 54, 55, 58, 59, 62, 63, 66, 67, 70, 71, 74, 75, 78, 79, 82, 83, 86, 87, 90, 91, 94, 95, 98 y 99 (Tabla 2). Además se añade para cada polimorfismo, un oligonucleótido OC cuya secuencia posee una región en el extremo 3' específica del gen, una región central para la hibridación con sondas universales y una región en el extremo 5' para la amplificación universal, SEQ ID NO: 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96 y 100 (Tabla 2). La hibridación tiene lugar a 60ºC durante 7 minutos.

- Ligación de los oligonucleótidos. Se añade una disolución que contiene la enzima Ligasa 65 (MRC-Holland). Se mantiene a 60ºC durante 7 minutos y se inactiva mediante tratamiento térmico (5 minutos a 98ºC).

La reacción de amplificación tiene lugar mediante PCR con una pareja de cebadores universales que hibridan con las colas incorporadas en los oligonucleótidos ligados. En la reacción de amplificación A, se emplean los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4, y en la reacción B, los cebadores SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. La mezcla de reactivos empleada contiene tampón de amplificación, enzima polimerasa, nucleótidos y cebadores universales, estando los cebadores SEQ ID NO: 1 y 2 marcados con digoxigenina en el extremo 5'. La disolución que contiene los productos de ligación se añade a la mezcla de reactivos y se aplica el programa de temperaturas. No se requiere ningún paso de purificación o marcaje posterior.

El anclaje de las sondas, funcionalizadas con biotina, se realiza vía adsorción indirecta (estreptavidina/biotina) sobre la cara de policarbonato del DVD-R en la que incidirá el láser del lector/grabador de DVDs. Las sondas son genéricas, es decir, no presentes en el genoma diana, pero complementarias a la cola presente en el oligo OC de cada gen y polimorfismo SEQ ID NO: 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93 y 97 (Tabla 2).

La hibridación de los productos amplificados con las sondas se realiza diluyendo 1/10 los productos en tampón de hibridación (tampón citrato sódico salino 65 mM, pH 7 y 25% de formamida). Las disoluciones de cada reacción de discriminación (A y B) se hibridan en su correspondiente micromatriz de sondas. El proceso se lleva a cabo en estufa a 37ºC durante una hora.

El revelado se realiza por incubación del disco con un anticuerpo de oveja anti-digoxigenina (abcam, ab64509) y un anticuerpo anti-oveja marcado con la enzima peroxidasa (HRP) (abcam, ab6747) en tampón fosfato salino 100 mM, pH 7,5, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras añadir disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina se forma un precipitado que será detectado al leer el disco con un lector/grabador de DVDs, registrando la variación de intensidad del haz reflejado.

La figura 10 muestra la imagen resultante del genotipado simultáneo de 24 SNPs de un individuo. El formato de la matriz de sondas presenta un diseño con 26 sondas (24 genes y 2 controles) con 4 réplicas de cada una.

Tabla 2: Listado de oligonucleótidos utilizados para el genotipado mediante ligación, amplificación por PCR e hibridación con sondas universales ancladas sobre disco DVD (Ejemplo 1: 24 genes)

Gen (código rs)	Sonda (SEQ ID NO:)	OD-A (SEQ ID NO:)	OD-B (SEQ ID NO:)	OC (SEQ ID NO:)
ABCB1 (rs1045642)	5	6	7	8
CYP2C19*17 (rs12248560)	9	10	11	12
COMT (rs4680)	13	14	15	16
CYP2C9*3 (rs1057910)	17	18	19	20
CYP2D6 (rs3892097)	21	22	23	24
DRD2 (rs6277)	25	26	27	28
CYP2D6*41/69 (rs28371725)	29	30	31	32
DRD2;ANKK1 (rs1800497)	33	34	35	36
CYP3A5 (rs776746)	37	38	39	40
OPRM1 (rs1799971)	41	42	43	44
GRIK2 (rs2518224)	45	46	47	48
GSK3B (rs13321783)	49	50	51	52
CYP2C9*2 (rs1799853)	53	54	55	56
LPHN3 (rs2345039)	57	58	59	60
LPHN3 (rs6551665)	61	62	63	64
MTHFR (rs1801133)	65	66	67	68
CHRNA5 (rs1696996)	69	70	71	72
RGS4 (rs2661319)	73	74	75	76
ADRA2A (rs1800544)	77	78	79	80
LOC729622	81	82	83	84

(rs4675690)				
IC (control interno)	85	86	87	88
GNB3 (rs5443)	89	90	91	92
DRD4 (rs11246226)	93	94	95	96
SL6CA2 (rs5569)	97	98	99	100

Ejemplo 2: Genotipado de SNPs mediante ligación en fase sólida sobre disco óptico

La muestra de ADN se obtiene a partir de suero sanguíneo. Para cada muestra se llevan a cabo dos reacciones de discriminación alélica (A y B), en dos zonas diferentes del disco. Se emplean discos ópticos tipo discos versátiles digitales de 12 cm de diámetro (DVD-R) como soporte de ensayo y un lector/grabador de DVDs como detector. El protocolo posee diferentes pasos (Figura 11). Comienza con una reacción de ligación en fase sólida en la zona del disco que contiene inmovilizados cada uno de los oligonucleótidos discriminantes. Posteriormente, se realiza una amplificación dispensando sobre el disco uno o dos de los cebadores universales que poseen las mismas secuencias o complementarias reversas a las colas de los OD y OC, respectivamente.

Para ello, se realiza la desnaturalización del ADN, mezclando el extracto de ADN genómico con el tampón de reacción e incubando a 95 ºC durante 5 min y, posteriormente, se dispensa sobre la micromatriz de un disco DVD con los oligonucleótidos OD (Tabla 3). Éstos poseen el extremo 5' fosforilado y están anclados vía covalente en la superficie del disco a través de su extremo 3' y un grupo amino, siguiendo un formato de micromatriz. También se añaden los oligonucleótidos comunes (OC), listados en tabla 3, y la enzima Ligasa 65, incubándose a 60ºC durante al menos 30 min en agitación. El posterior ciclo de lavado con tampón fosfato salino 100 mM, pH 7,5 y agua, elimina el exceso de OC y ADN molde. El resultado de la reacción es la formación de los productos de ligación en aquellos casos en que se encuentre el correspondiente alelo.

La amplificación isoterma tipo RPA se logra dispensando la mezcla que contiene el tampón de amplificación, los cebadores universales y los deoxinucleótidos funcionalizados con biotina. En la reacción de amplificación A se emplean los

cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4, y en la reacción B los cebadores SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. Se incuba durante 60 min a 40ºC y se lava con disolución de lavado. El posterior revelado se lleva a cabo con anticuerpo anti-biotina conjugado a nanopartículas de oro de 10 nm de diámetro. Se realiza un revelado metalográfico basado en la reacción de reducción de iones plata catalizada por oro y la consecuente formación de depósitos de plata metálica sobre la superficie del disco óptico. La variación de intensidad del haz reflejado es registrada con un lector/grabador de DVDs.

La figura 12 muestra la imagen resultante del genotipado simultáneo de 18 SNPs en una muestra de un mismo individuo. El formato de la matriz presenta un diseño con 20 sondas (18 genes y 2 controles) y 4 réplicas de cada una.

Tabla 3: Listado de oligonucleótidos utilizados para el genotipado mediante ligación y amplificación-hibridación en fase sólida sobre DVD

Gen (código rs)	OD-A (SEQ ID NO:)	OD-B (SEQ ID NO:)	OC (SEQ ID NO:)
CASP7 (rs1127687)	101	102	103
ERCC1 (rs11615)	104	105	106
CHRNA5 (rs16969968)	107	108	109
ERCC2 (rs13181)	110	111	112
ABCB1 (rs1045642)	113	114	115
LPHN3 (rs6551665)	116	117	118
DRD4 (rs11246226)	119	120	121
LPHN3 (rs2345039)	122	123	124
OPRM1 (rs1799971)	125	126	127
GRIK2 (rs2518224)	128	129	130
CYP3A4 (rs35599367)	131	132	133
ADRA2A (rs1800544)	134	135	136
RGS4 (rs2661319)	137	138	139
COMT	140	141	142

(rs4680)			
CYP3A5 (rs776746)	143	144	145
SL6CA2 (rs5569)	146	147	148
IC (control interno)	149	150	151
VKORC1 (rs9923231)	152	153	154

RESULTADOS:

El método de la presente invención resuelve ventajosamente el problema del genotipado de polimorfismo y/o mutaciones que las aproximaciones previas conocidas por el experto en la materia, basadas en hibridación alelo-específica combinada con tecnología de disco compacto (o no) o que las aproximaciones basadas en ligación combinadas con electroforesis capilar, técnicas de microscopía óptica, escáneres de fluorescencia u otros instrumentos. Respecto a las primeras se mejora el número de polimorfismos genotipados, condiciones de trabajo, flexibilidad del sistema, etc., y en comparación con las segundas, se trata de un sistema de medida sencillo, barato, portátil y, con gran capacidad de trabajo.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de al menos un polimorfismo genético u otra mutación, preferiblemente de polimorfismo de un único nucleótido (SNP), en una muestra aislada de un sujeto que comprende los siguientes pasos:
    a. ligación alelo-específica entre oligonucleótidos en disolución o en fase sólida, donde la ligación se realiza mediante una ligasa termoestable durante un tiempo de entre 5 a 15 minutos y posteriormente se inactiva la ligasa;
    b. amplificación de al menos un producto de ligación obtenido en el paso (a), donde la amplificación se realiza utilizando al menos un cebador universal en disolución o en fase sólida;
    c. hibridación de al menos un producto amplificado obtenido en el paso (b) con al menos una sonda, donde la sonda está fijada en una superficie; y
    d. detección del polimorfismo y/o mutación del producto obtenido en el paso (c);

    donde la etapa (b) de amplificación se realiza posteriormente a la etapa (a) de ligación.

2. Método según la reivindicación 1 donde los polimorfismos y/o mutaciones detectados simultáneamente son entre 5 y 200; preferiblemente son entre 15 y 100.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde cada ligación del paso (a) se realiza mediante al menos un oligonucleótido discriminante y un oligonucleótido común.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la ligación tiene lugar en fase sólida, y al menos uno de los oligonucleótidos está anclado en la superficie.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde en el paso (a) de la ligación la inactivación se lleva a cabo a 95-99 ºC, preferiblemente a 98ºC, durante entre 3-10 minutos, preferiblemente 5 minutos.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la amplificación del paso (b) se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa y/o reacción de amplificación isoterma, preferiblemente amplificación recombinasa polimerasa o amplificación por desplazamiento de hebra, en fase sólida.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la amplificación del paso (b) se realiza utilizando nucleótidos marcados y/o cebadores marcados; preferiblemente los marcadores son antígenos, partículas o fluoróforos.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde los oligonucleótidos, sondas y/o cebadores anclados sobre la superficie son específicos, genéricos o comprenden una región específica y una genérica.

9. Método según la reivindicación 8 donde el anclaje sobre la superficie se realiza, en formato de micromatriz, preferiblemente además incluye controles.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la superficie en la que se anclan los oligonucleótidos, sondas, y/o cebadores, es un disco óptico o disco compacto, y la detección (paso (d)) se realiza utilizando lectores de disco óptico o disco compacto.

11. Método según la reivindicación 10 donde los discos se seleccionan de la lista que consiste en: CD, DVD, Blu-ray, sin modificar o modificada, que preferiblemente comprenden superficies tratadas o discos ópticos multicapa.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 donde la detección se realiza de una partícula, un depósito metalográfico, un depósito enzimático o un compuesto coloreado.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde el sujeto es un organismo, mezcla de organismos o sus derivados, preferiblemente es un humano.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde la muestra aislada se selecciona de la lista que consiste en: sangre, suero, plasma, linfa, orina, saliva, lavado broncoalveolar, esputo, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, tejido y secreción lacrimal.

15. Método según la reivindicación 14 donde la muestra es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

DIBUJOS

FIG. 1

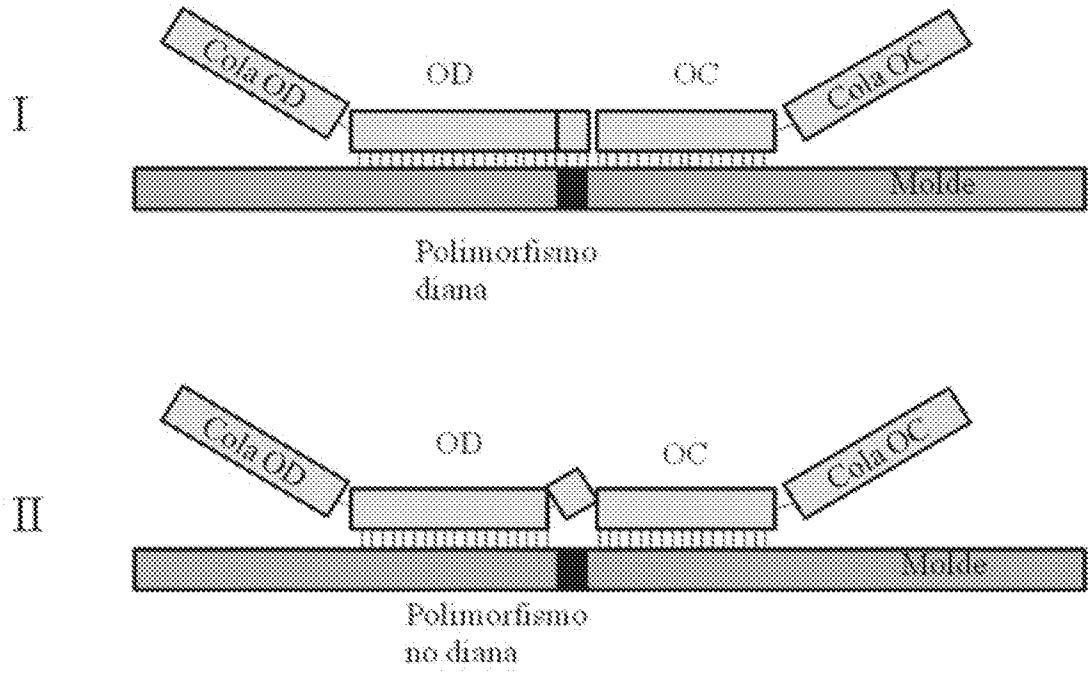


FIG. 2

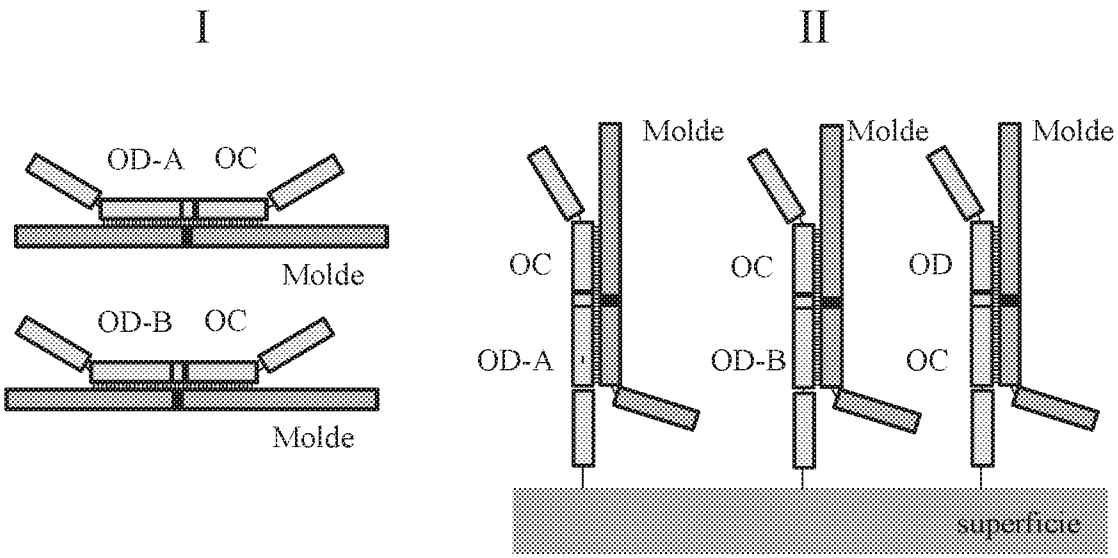


FIG. 3

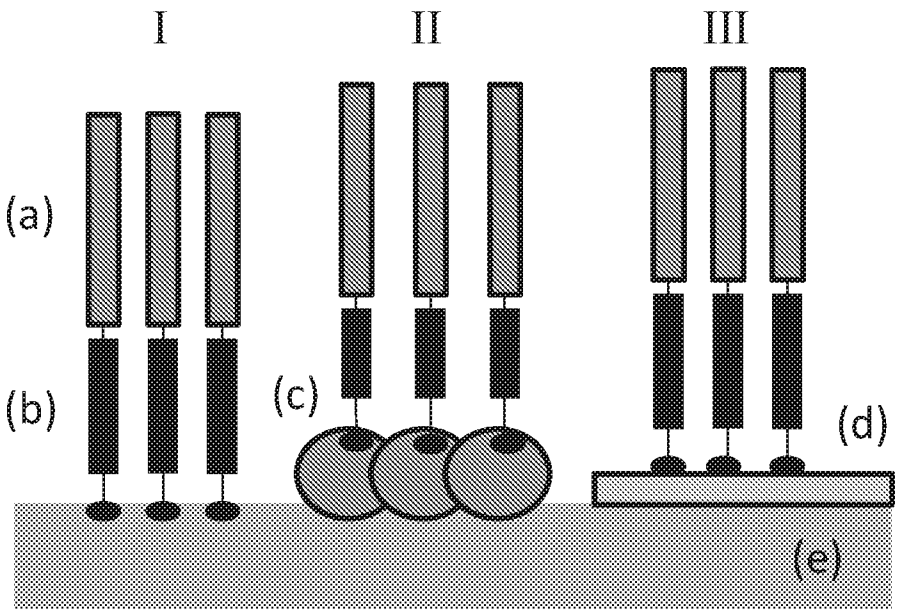

I
II
III
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)

FIG. 4

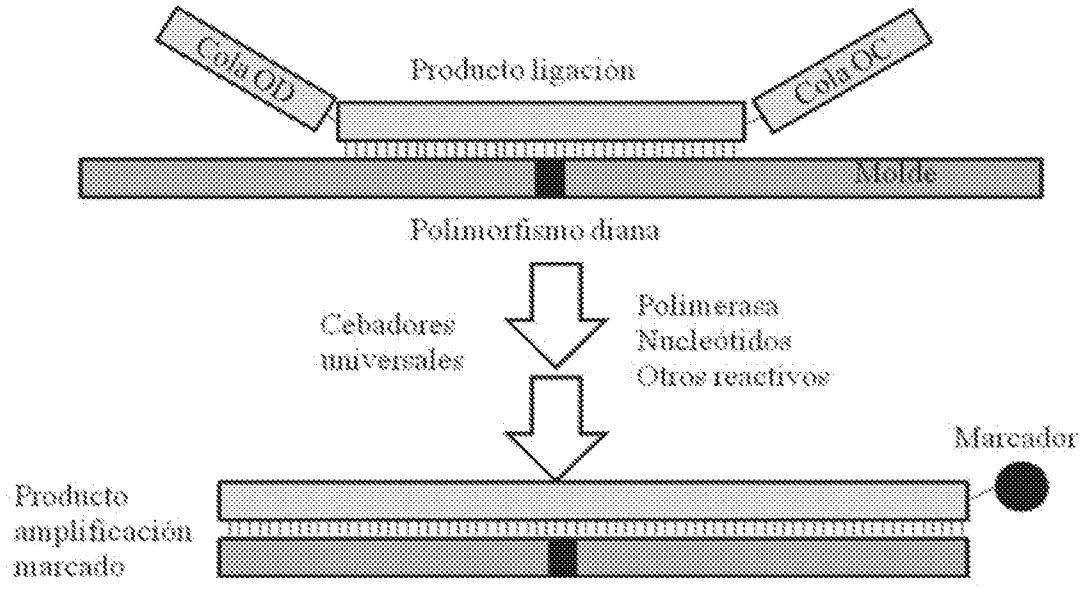

Cola OD
Producto ligación
Cola OC
Molde
Polimorfismo diana
Cebadores universales
Polimerasa
Nucleótidos
Otros reactivos
Marcador
Producto amplificación marcado

FIG. 5

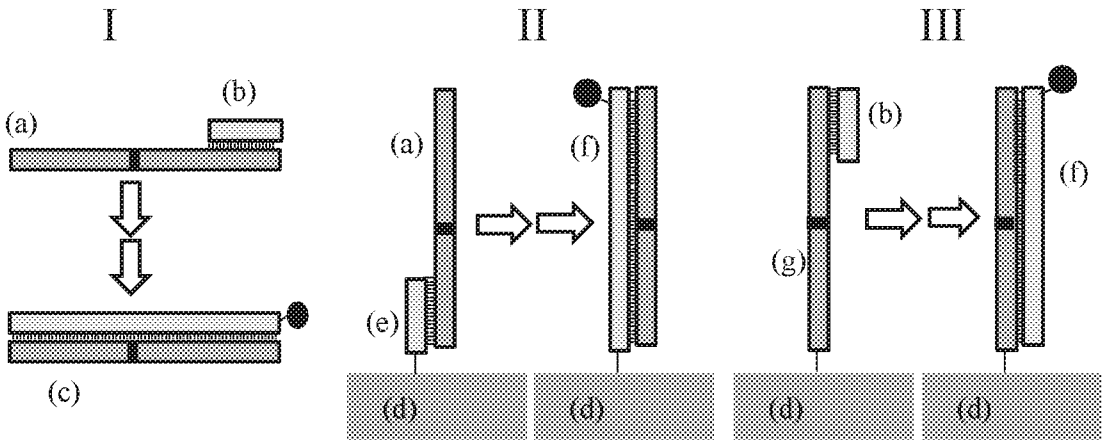


FIG. 6

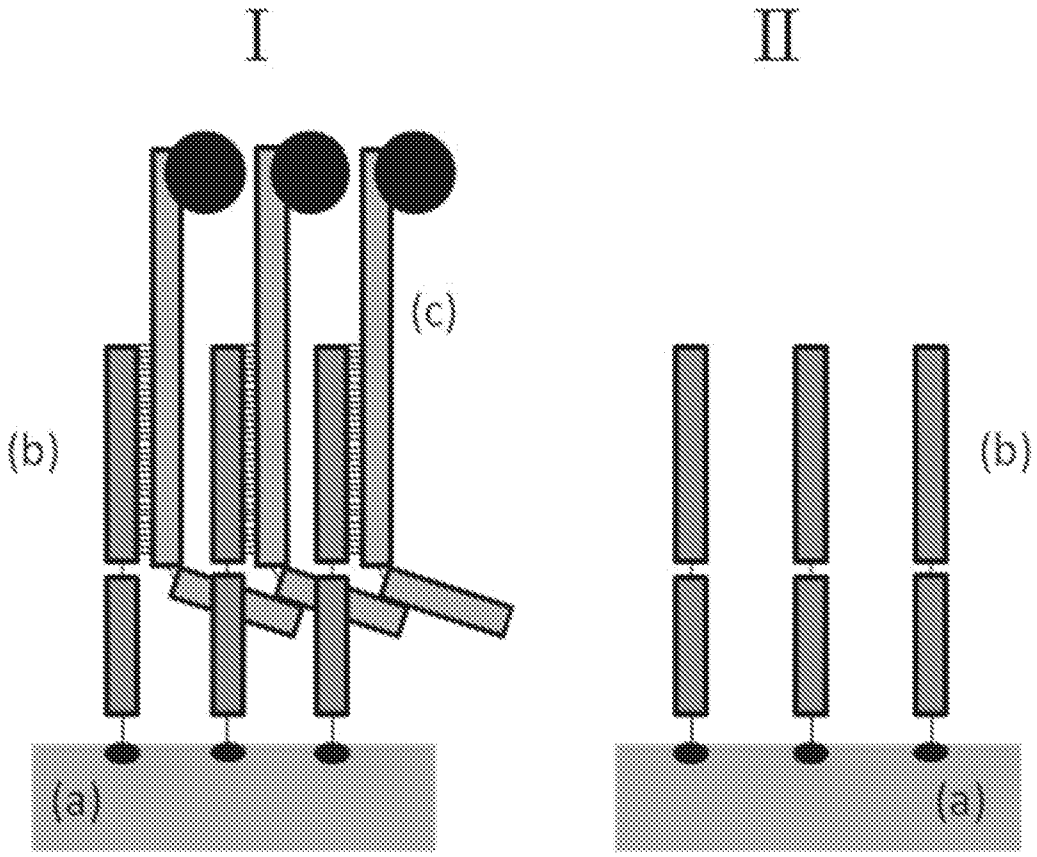


FIG. 7

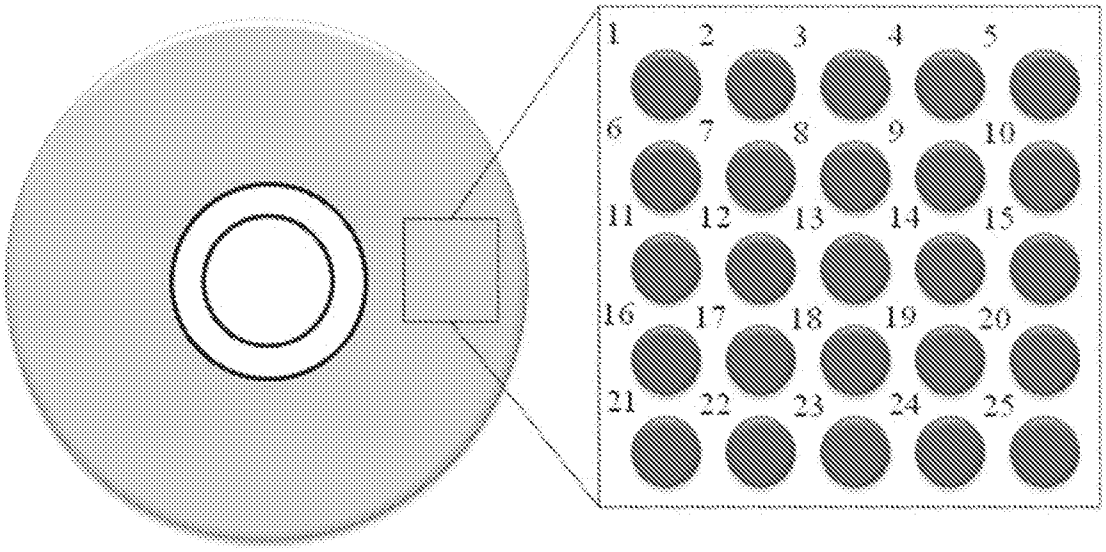

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

FIG. 8

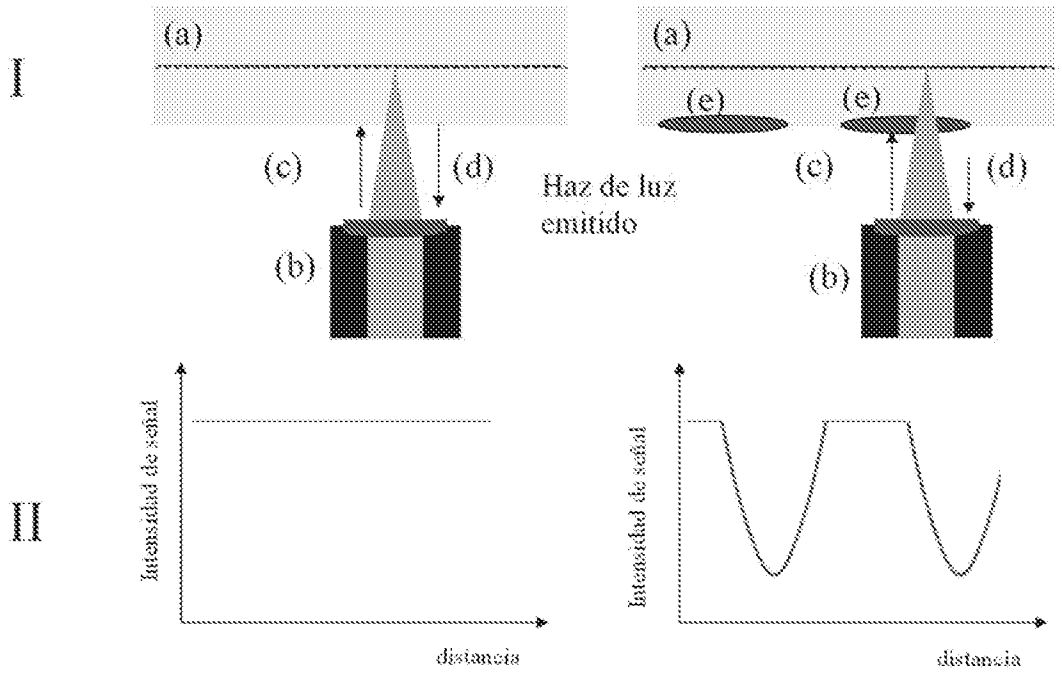

I
(a)
(c)
(d)
(b)
Haz de luz emitido
(a)
(e)
(e)
(c)
(d)
(b)
II
Intensidad de señal
distancia
Intensidad de señal
distancia

FIG. 9

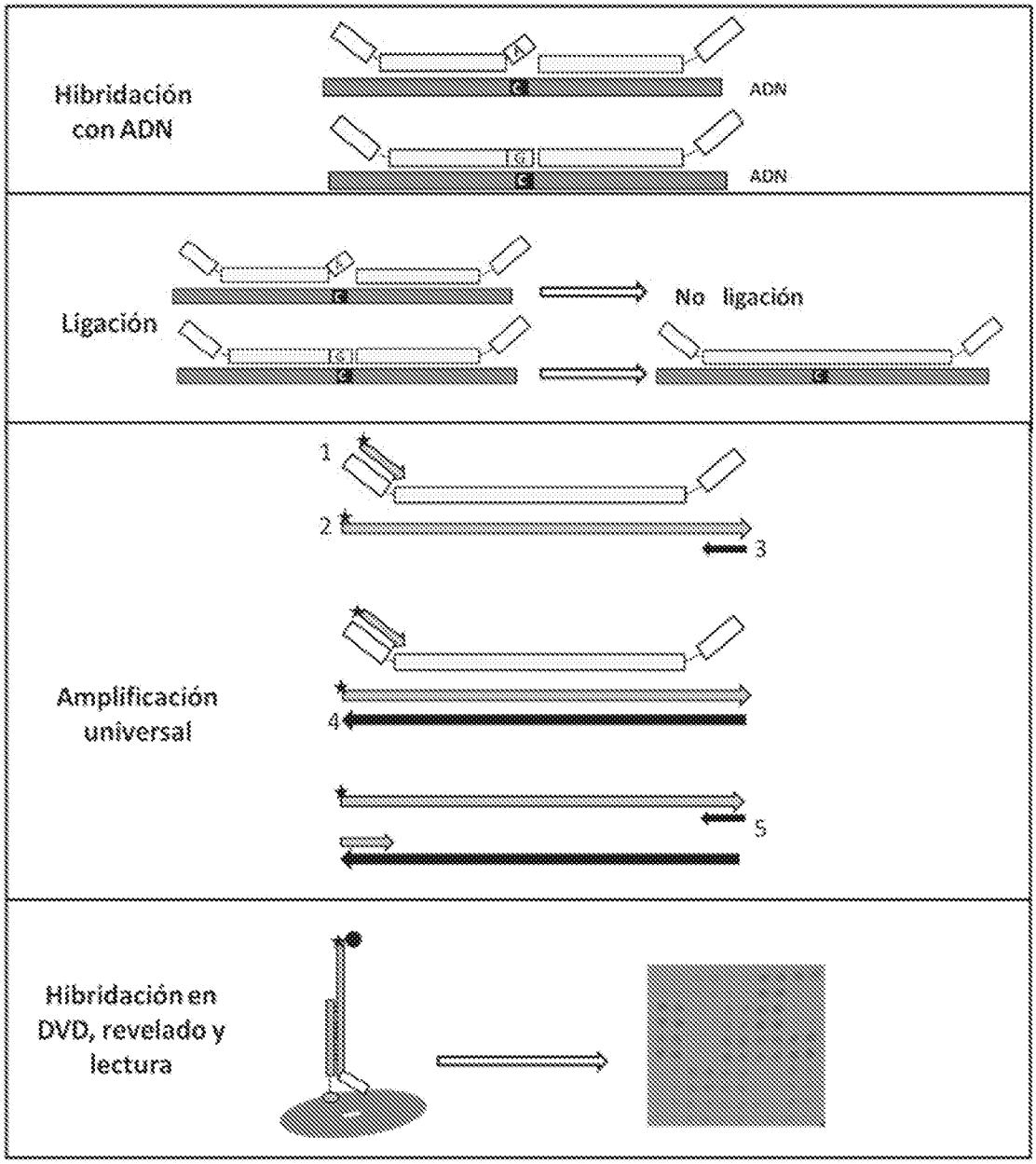

Hibridación con ADN
ADN
ADN
Ligación
No ligación
1
2
3
Amplificación universal
4
5
Hibridación en DVD, revelado y lectura

FIG. 10

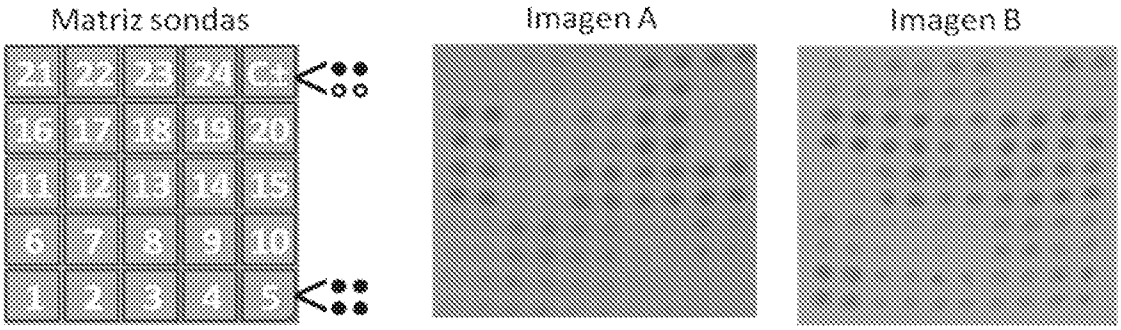

Matriz sondas
Imagen A
Imagen B
21 22 23 24 25
16 17 18 19 20
11 12 13 14 15
6 7 8 9 10
1 2 3 4 5

FIG. 11

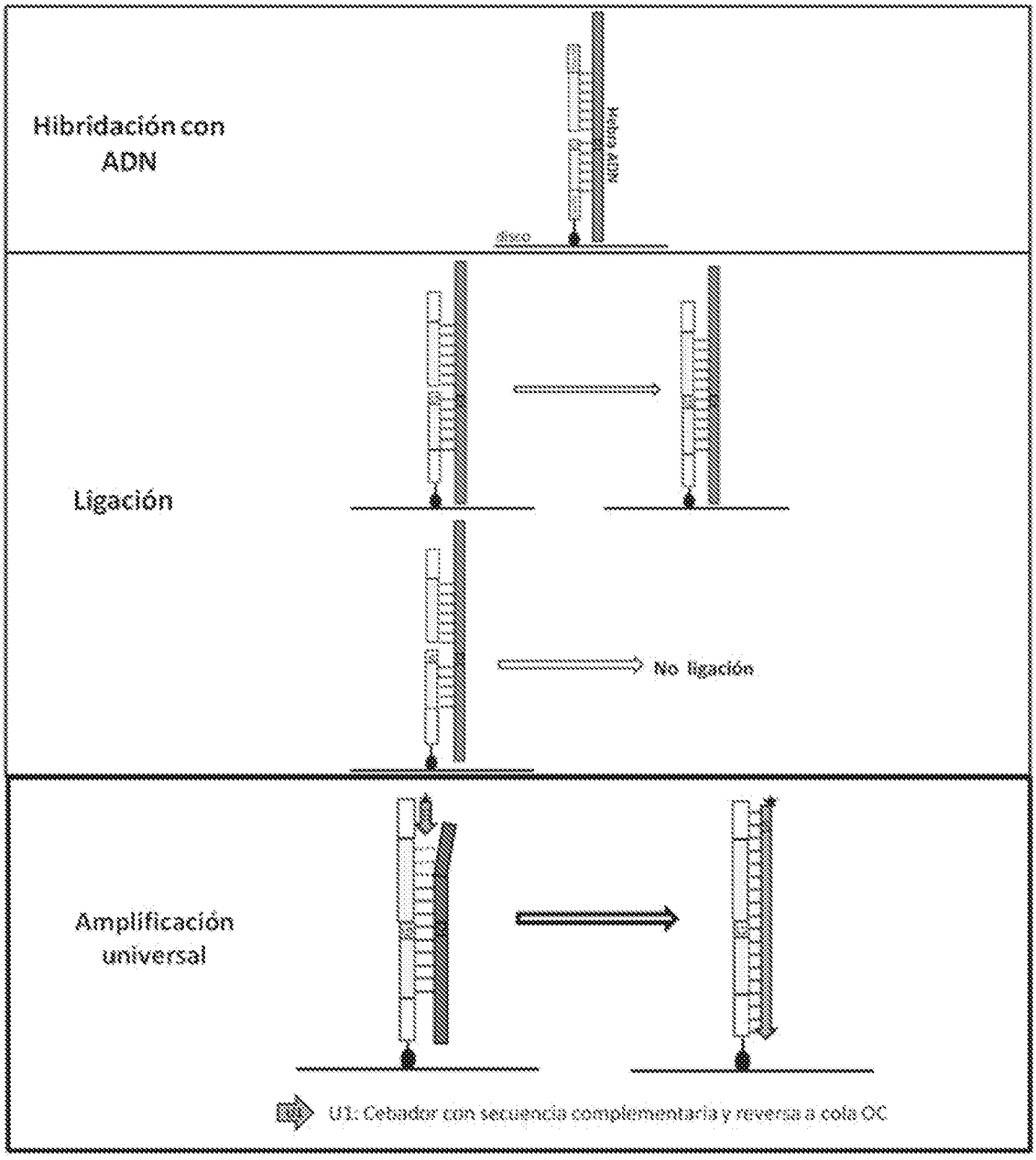
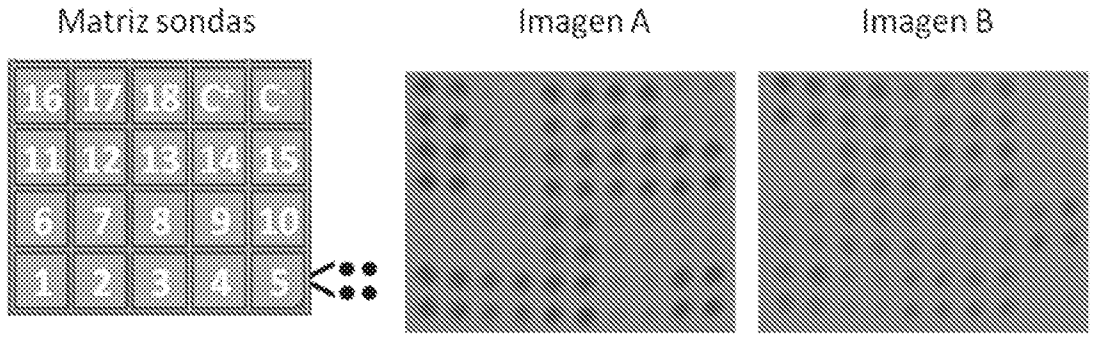

Hibridación con ADN
Ligación
No ligación
Amplificación universal
U1: Cebador con secuencia complementaria y reversa a cola OC

FIG. 12


Matriz sondas
Imagen A
Imagen B
16
17
18
C*
C
11
12
13
14
15
6
7
8
9
10
1
2
3
4
5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015069787 A1 (HTG MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 14/05/2015, claims.	1-15
A	US 2012028826 A1 (FU GLENN K ET AL.) 02/02/2012, claims.	1-15
A	WO 2005001113 A2 (UNIV JEFFERSON ET AL.) 06/01/2005, claims	1-15
A	HARDENBOL PAUL et al. Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: Over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay. Genome Research February 2005 00/02/2005 VOL: 15 No: 2 Pages: 269-275 ISSN 1088-9051 (ISSN print), figure 2. Methods	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27/09/2016	**(30/09/2016)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer J. Manso Tomico Telephone No. 91 3495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070537

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARDENBOL PAUL et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes.Nature Biotechnology, 20030601 Gale Group Inc, US 01/06/2003 VOL: 21 No: 6 Pages: 673 - 678 ISSN 1087-0156 Doi: doi:10.1038/nbt821, Page 674. Methods.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2016/070537

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2015069787 A1	14.05.2015	US2016265036 A1 EP3066218 A1	15.09.2016 14.09.2016
US2012028826 A1	02.02.2012	US2013296172 A1	07.11.2013
WO2005001113 A2	06.01.2005	US2007111204 A1	17.05.2007

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/070537

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
C12Q1/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2015069787 A1 (HTG MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 14/05/2015, reivindicaciones.	1-15
A	US 2012028826 A1 (FU GLENN K ET AL.) 02/02/2012, reivindicaciones.	1-15
A	WO 2005001113 A2 (UNIV JEFFERSON ET AL.) 06/01/2005, reivindicaciones	1-15
A	HARDENBOL PAUL et al. Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: Over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay. Genome Research February 2005 00/02/2005 VOL: 15 No: 2 Pags: 269-275 ISSN 1088-9051 (ISSN print), figura 2. Métodos.	1-15

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
27/09/2016	**30 de septiembre de 2016 (30/09/2016)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado J. Manso Tomico Nº de teléfono 91 3495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/070537

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	HARDENBOL PAUL et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. Nature Biotechnology, 20030601 Gale Group Inc, US 01/06/2003 VOL: 21 No: 6 Pags: 673 - 678 ISSN 1087-0156 Doi: doi:10.1038/nbt821, página 674. Métodos.	1-15

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070537

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2015069787 A1	14.05.2015	US2016265036 A1 EP3066218 A1	15.09.2016 14.09.2016
US2012028826 A1	02.02.2012	US2013296172 A1	07.11.2013
WO2005001113 A2	06.01.2005	US2007111204 A1	17.05.2007