

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 092**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10759145 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2414544**

54 Título: **Amplificación de sondas dependiente de ligamiento químico (CLPA)**

30 Prioridad:

01.04.2009 US 165839 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2014

73 Titular/es:

**DXTERITY DIAGNOSTICS INCORPORATED
(100.0%)
2214 E. Gladwick Street
Rancho Dominguez, CA 90220, US**

72 Inventor/es:

TERBRUEGGEN, ROBERT

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 469 092 T3

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

DESCRIPCIÓN

Amplificación de sondas dependiente de ligamiento químico (CLPA)

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a métodos para detectar ácidos nucleicos en una muestra usando ligamiento químico.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a métodos para detectar una o más dianas de ácido nucleico presentes en una muestra. La detección de ácidos nucleicos específicos es una herramienta importante para la medicina de diagnóstico y la investigación en biología molecular.

10 Los ensayos de sonda génica desempeñan actualmente papeles en la identificación de organismos infecciosos tales como bacterias y virus, en el sondeo de la expresión de genes normales y mutantes y en la identificación de genes asociados a enfermedad o lesión, tales como oncogenes, en el tipado de tejido para compatibilidad antes del trasplante de tejido, en la comparación de muestras de tejido o sangre para medicina forense, para responder ante situaciones de respuesta a emergencias como un incidente nuclear o un brote de gripe pandémico, en la determinación del pronóstico o causa de una enfermedad y para explorar la homología entre genes de diferentes especies.

15 Idealmente, un ensayo de sonda génica debería ser sensible, específico y fácilmente automatizable (para una revisión, véase Nickerson, en Current Opinion in Biotechnology (1993) 4:48-51.) El requisito de sensibilidad (concretamente, bajos límites de detección) se ha aliviado en gran medida por el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras tecnologías de amplificación que permiten a los investigadores amplificar exponencialmente una secuencia de ácido nucleico específica antes del análisis (para una revisión, véase Abramson *et al.*, Current Opinion in Biotechnology, (1993) 4:41-47). Por ejemplo, se ha mostrado que la amplificación por PCR múltiple de loci de SNP con hibridación posterior con matrices oligonucleotídicas es un método exacto y fiable de genotipado simultáneo de cientos de SNP (véase Wang *et al.*, Science, (1998) 280:1077; véase también Schafer *et al.*, Nature Biotechnology, (1989) 16:33-39).

25 La especificidad sigue siendo también un problema en muchos ensayos de sonda génica actualmente disponibles. La extensión de la complementariedad molecular entre sonda y diana define la especificidad de la interacción. Las variaciones en la composición y concentración de las sondas, dianas y sales en la reacción de hibridación, así como la temperatura de reacción y longitud de la sonda, pueden alterar todas la especificidad de la interacción sonda/diana.

30 Puede ser posible en algunas circunstancias distinguir las dianas con complementariedad perfecta de las dianas con desapareamientos, aunque esto es generalmente muy difícil usando la tecnología tradicional, puesto que pequeñas variaciones en las condiciones de reacción alterarán la hibridación. Las técnicas más nuevas con la especificidad necesaria por detección de desapareamientos incluyen los ensayos de digestión de sonda en que los desapareamientos crean sitios para escisión de sonda, y los ensayos de ligamiento de ADN en que los desapareamientos de un solo punto evitan el ligamiento.

35 Están disponibles una variedad de métodos enzimáticos y no enzimáticos para detectar variaciones de secuencia. Los ejemplos de métodos basados en enzimas incluyen el ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) Invader™, métodos de extensión de una sola base, PCR alélica y análisis de sonda competitiva (por ejemplo, secuenciación competitiva por hibridación). Las reacciones de ligamiento de ADN enzimático son bien conocidas en la materia (Landegren, Bioessays (1993) 15(11): 761-5; Pritchard *et al.*, Nucleic Acids Res. (1997) 25(17): 3403-7; Wu *et al.*, Genomics, (1989) 4(4): 560-9) y se han usado ampliamente en la detección de SNP, reacciones de amplificación enzimática y reparación de ADN.

40 Se han desarrollado una serie de métodos de ligamiento químico no enzimáticos o mediados por molde que pueden usarse para detectar variaciones de secuencia. Estos incluyen métodos de ligamiento químico que utilizan reactivos de acoplamiento tales como *N*-cianoimidazol, bromuro de cianógeno e hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Véanse Metelev, V.G., *et al.*, Nucleosides & Nucleotides (1999) 18: 2711; Luebke, K.J. y Dervan, P.B. J. Am. Chem. Soc. (1989) 111: 8733; y Shabarova, Z.A., *et al.*, Nucleic Acids Research (1991) 19: 4247.

45 Kool (patente de EE.UU. nº 7.033.753) describe el uso de ligamiento químico y transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para detectar polimorfismos genéticos. La lectura en este proceso está basada en el cambio de intensidad de fluorescencia en la fase de disolución.

50 El documento WO 2007/133703 describe el uso de métodos de ligamiento químico, composiciones y reactivos para la detección de ácidos nucleicos mediante la detección de micromatrices.

Otros métodos de ligamiento químico hacen reaccionar un grupo 5'-tosilato o 5'-yodo con un grupo 3'-fosforotioato, dando como resultado una estructura de ADN en que un azufre reemplaza a uno de los átomos de oxígeno del puente fosfodiéster. Véanse Gryanov, S.M. y Letsinger, R.L., Nucleic Acids Research (1993) 21:1403; Xu, Y. y Kool, E.T. Tetrahedron Letters (1997) 38: 5595; y Xu, Y. y Kool, E.T., Nucleic Acids Research (1999) 27: 875.

5 Algunas de las ventajas de usar enfoques no enzimáticos para la detección de dianas de ácido nucleico incluyen la menor selectividad por estructuras análogas a ADN no natural, la capacidad de usar secuencias diana de ARN, el menor coste y la mayor robustez en diversas condiciones. Letsinger *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.780.613) han descrito anteriormente un autoligamiento covalente no enzimático irreversible de oligonucleótidos unidos a molde adyacentes en el que un oligonucleótido tiene un grupo 5' desplazable y el otro oligonucleótido tiene un grupo 3' tiosforilo.

10 Las solicitudes PCT WO 95/15971, WO96/40712 y WO98/20162 describen composiciones novedosas que comprenden ácidos nucleicos que contienen restos de transferencia de electrones, incluyendo electrodos, que permiten métodos novedosos de detección de la hibridación de ácido nucleico.

15 Una tecnología que ha ganado una relevancia aumentada implica el uso de matrices de ADN (Marshall *et al.*, Nat. Biotechnol. (1998) 16(1): 27-31), especialmente para aplicaciones que implican la medida simultánea de numerosas dianas de ácido nucleico. Las matrices de ADN se usan lo más a menudo para la monitorización de la expresión génica, en que se mide simultáneamente la concentración relativa de 1 a 100.000 dianas de ácido nucleico (ARNm). Las matrices de ADN son pequeños dispositivos en que se enlazan sondas de anclaje de ácido nucleico a una superficie con un patrón que es distinto y conocido en el momento de la fabricación (Marshall *et al.*, Nat Biotechnol. (1998) 16(1): 27-31) o pueden descifrarse exactamente en un momento posterior, tal como es el caso de las matrices de perla (Steemers *et al.*, Nat Biotechnol. (2000) 18(1): 91-4; y Yang *et al.*, Genome Res. (2001) 11(11): 1888-98.). Después de una serie de etapas de procesamiento previas, se pone en contacto la muestra de interés con la matriz de ADN, las dianas de ácido nucleico en la muestra hibridan con los oligonucleótidos anclados sobre la superficie y se determinan la identidad, y a menudo la concentración, de los ácidos nucleicos diana en la muestra.

25 Muchos de los métodos de detección de ácido nucleico en uso actualmente tienen características y/o limitaciones que dificultan su aplicabilidad amplia. Por ejemplo, en el caso de micromatrices de ADN, antes de poner en contacto una muestra con la micromatriz, existen habitualmente una serie de etapas de procesamiento que deben efectuarse en la muestra. Aunque estas etapas varían dependiendo del fabricante de la matriz y/o de la tecnología que se use para leer la matriz (fluorescencia, electroquímica, quimioluminiscencia, magnetorresistencia, deflexión de micropalanca, resonancia de plasmón de superficie), estas etapas de procesamiento entran habitualmente dentro de algunas categorías generales: Aislamiento y purificación de ácido nucleico, amplificación enzimática, incorporación de marcador detectable y limpieza postamplificación. Son otras etapas comunes la concentración de muestra, la fragmentación de diana amplificada para reducir el tamaño medio de la diana de ácido nucleico y la digestión con exonucleasa para convertir las dianas amplificadas por PCR en especies monocatenarias.

35 El requisito de muchas etapas de procesamiento previas antes de poner en contacto la matriz de ADN con la muestra puede aumentar significativamente el tiempo y coste de detección de una diana o dianas de ácido nucleico por estos métodos. Puede tener también implicaciones significativas sobre la calidad de los datos obtenidos. Por ejemplo, algunos procedimientos de amplificación son muy sensibles a la degradación de la diana y actúan mal si el material ácido nucleico de entrada no está bien conservado (Foss *et al.*, Diagn. Mol. Pathol. (1994) 3(3): 148-55).

40 Las tecnologías que pueden eliminar o reducir el número y/o complejidad de las etapas de procesamiento previas podrían reducir significativamente el coste y mejorar la calidad de los resultados obtenidos a partir de un ensayo de matriz de ADN. Un método para reducir las etapas de procesamiento previas implica usar reacciones de ligamiento para aumentar la fuerza de señal y mejorar la especificidad.

45 Sigue habiendo la necesidad de métodos y composiciones para una detección eficaz y específica de ácidos nucleicos. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para reacciones de ligamiento químico no enzimático que proporcionan una detección muy rápida de diana y procesos simplificados en gran medida de detección y medida de dianas de ácido nucleico.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

50 Por consiguiente, la invención se refiere a un método y a un uso que comprende proporcionar un sustrato de ligamiento, que comprende una secuencia de ácido nucleico diana que comprende al menos un primer dominio diana y un segundo dominio diana, y una primera y segunda sondas de ligamiento como se dan a conocer en las reivindicaciones adjuntas 1 a 10. Las sondas de ligamiento comprenden una secuencia de relleno de longitud y/o secuencia variable. La primera sonda de ligamiento comprende un primer dominio de sonda sustancialmente complementario del primer dominio de diana y un resto de ligamiento 5'. La segunda sonda de ligamiento comprende un segundo dominio de sonda sustancialmente complementario del segundo dominio de diana y un resto de ligamiento 3'. Opcionalmente, el primer dominio de diana y el segundo dominio de diana están separados por al menos un nucleótido. Opcionalmente, al menos una de dichas primera y segunda sondas de ligamiento comprende una secuencia de anclaje y/o un marcador, incluyendo una secuencia de unión a la sonda marcada. La primera y segunda sondas de ligamiento se ligan en ausencia de enzima ligasa añadida exógenamente, formando un producto

de ligamiento. El producto ligado puede capturarse opcionalmente sobre un sustrato que comprende una sonda de captura sustancialmente complementaria de dicha secuencia de anclaje y detectarse. El producto de ligamiento puede amplificarse y detectarse por electroforesis capilar, análisis de micromatrices o cualquier otro método adecuado.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Representación esquemática de una realización del ensayo de CLPA-CE.

Figura 2. Representación esquemática de una realización del ensayo de CLPA-MDM.

Figura 3. Representación esquemática que muestra una realización de la reacción de CLPA de 2 sondas y de 3 sondas.

10 Figura 4. Representación esquemática de una resina de síntesis de ADN que puede usarse para fabricar ADN con un grupo saliente 3'-dabsilo.

Figura 5. Representación esquemática del flujo de proceso para una realización del ensayo de CLPA-CE.

Figura 6. Gráfica esquemática que muestra el diseño de sonda para el ensayo de CLPA en el que se incorpora una secuencia de relleno de tamaño variable.

15 Figura 7. Perfil de separación electroforética en una muestra analizada por CLPA-CE.

Figura 8. Relación lineal entre la concentración de diana y la altura de pico en el análisis de CLPA-CE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique otra cosa, técnicas y descripciones convencionales de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombina-
20 tes), biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de las habilidades de la materia. Dichas técnicas convencionales incluyen síntesis en matriz polimérica, hibridación, ligamiento y detección de hibridación usando un marcador. Pueden tenerse ilustraciones específicas de las técnicas adecuadas por referencia al ejemplo siguiente en la presente memoria. Sin embargo, pueden usarse también otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales pueden encontrarse en manuales de laboratorio estándares tales como "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series" (Vol. I-IV), "Using Antibodies: A
25 Laboratory Manual", "Cells: A Laboratory Manual", "PCR Primer: A Laboratory Manual" y "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) "Biochemistry" (4^o Ed.) Freeman, Nueva York, Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, Londres, Nelson and Cox (2000), Lehninger, "Principles of Biochemistry" 3^o Ed., W. H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y. y Berg *et al.*
30 (2002) "Biochemistry", 5^a Ed., W. H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y.

SUMARIO

La divulgación proporciona composiciones, aparatos y métodos para la detección de una o más dianas de ácido nucleico en una muestra que incluye dianas de ADN y ARN. Además, la muestra no necesita purificarse. Es más, la invención se refiere a analizar muestras impuras incluyendo muestras corporales tales como, pero sin limitación,
35 sangre completa. La invención proporciona métodos que utilizan dos o más sondas oligonucleotídicas que se unen reversiblemente a un ácido nucleico diana en estrecha proximidad entre sí y que poseen restos de ligamiento reactivos complementarios (debería observarse, como se describe adicionalmente en la presente memoria, que se hace referencia a los restos reactivos en la presente memoria como "restos de ligamiento"). Cuando las sondas se han unido a la diana en la orientación apropiada, pueden experimentar una reacción de ligamiento químico espontánea que produce un producto oligonucleotídico ligado. Después del ligamiento, se genera un nuevo producto que puede amplificarse mediante una reacción enzimática o química. En la realización preferida, la reacción de ligamiento químico une dos sondas que tienen sitios de cebador de PCR en ellas, por ejemplo, cebadores de PCR universales. Adicionalmente, en la invención una o ambas sondas de ligamiento contienen una secuencia de relleno,
40 o secuencia espaciadora variable, que están diseñada para tener longitudes diferentes para cada conjunto de sondas (concretamente, cada secuencia diana), dando así como resultado un producto de ligamiento que tiene una longitud específica de diana. Después del ligamiento, puede amplificarse ahora exponencialmente por PCR un oligonucleótido de longitud definida. De acuerdo con un aspecto de la invención, las sondas pueden poseer marcadores detectables (marcadores fluorescentes, marcadores electroquímicos, perlas magnéticas, nanopartículas, biotina) para ayudar a la identificación, purificación, cuantificación o detección del producto oligonucleotídico ligado. Las sondas pueden incluir también opcionalmente en su estructura: secuencias oligonucleotídicas de anclaje diseñadas para la captura posterior sobre un soporte sólido (micromatrices, microperlas, nanopartículas), manipuladores de moléculas que promueven la concentración o manipulación del producto ligado (partículas magnéticas, secuencias de codificación oligonucleotídicas) y secuencias promotoras para facilitar la amplificación secundaria posterior del producto ligado mediante una enzima como una ADN o ARN polimerasa. Las reacciones de ligamiento de la invención evolucionan rápidamente, son específicas de la diana o
55

dianas de interés y pueden producir múltiples copias del producto ligado para cada diana o dianas, dando como resultado una amplificación (a la que a veces se hace referencia en la presente memoria como "renovación de producto") de la señal detectable. Las reacciones de ligamiento de la invención no requieren la presencia de ligasas añadidas exógenamente, ni de enzimas adicionales, aunque algunas reacciones secundarias pueden basarse en el uso de enzimas tales como polimerasas como se describe a continuación. Las químicas de ligamiento pueden elegirse de muchos de los restos químicos descritos anteriormente. Son químicas preferidas aquellas que pueden incorporarse fácilmente a técnicas de fabricación rutinarias, son estables durante el almacenamiento y demuestran una gran preferencia por ligamiento específico de diana cuando se incorporan a un conjunto de sonda de ligamiento apropiadamente diseñado. Adicionalmente, para realizaciones que implican una amplificación posterior por una enzima, se prefieren químicas de ligamiento y diseños de sonda (incluyendo análogos nucleotídicos no naturales) que dan como resultado un producto de ligamiento que puede procesarse eficazmente por una enzima. La amplificación de la diana puede incluir también la renovación del producto de ligamiento, en el que el producto de ligamiento tiene una afinidad menor o comparable por el ácido nucleico de molde o diana que las sondas de ligamiento separadas. Por tanto, tras el ligamiento de las sondas hibridadas, se libera el producto de ligamiento de la diana, liberando la diana para que sirva como molde para una nueva reacción de ligamiento.

En una realización, las reacciones de ligamiento de la invención incluyen reacciones de transferencia. En esta realización, las sondas hibridan con la secuencia diana, pero en vez de ligarse conjuntamente las sondas oligonucleotídicas formando un producto de ligamiento, puede ocurrir una transferencia dirigida por ácido nucleico de una entidad molecular (incluyendo moléculas informadoras tales como fluoróforos, inactivadores, etc.) de una sonda oligonucleotídica a otra. Esta reacción de transferencia es análoga a la reacción de ligamiento, sin embargo en lugar de unirse dos o más sondas, una de las sondas se liga con la molécula de transferencia y la otra sonda es el "grupo saliente" de la reacción química. Se usa el término reacción de "transferencia" para distinguir entre la naturaleza diferente del producto final resultante. De forma importante, de modo similar a la reacción de ligamiento, la reacción de transferencia se facilita por la unión proximal de las sondas de transferencia sobre una diana de ácido nucleico, de tal modo que se detecta una señal significativa solo si las sondas han hibridado con el ácido nucleico en proximidad suficientemente cercana entre sí (por ejemplo, en sitios adyacentes) para que tenga lugar la reacción de transferencia.

Muestras

Por consiguiente, en un aspecto la presente divulgación proporciona composiciones y métodos para detectar la presencia o ausencia de secuencias diana en muestras. Como se apreciará por los especialistas en la materia, la disolución de muestra puede comprender cualquier número de cosas incluyendo, pero sin limitación, fluidos corporales (incluyendo, pero sin limitación, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, transpiración y semen, de prácticamente cualquier organismo, prefiriéndose las muestras de mamífero y prefiriéndose particularmente las muestras humanas); muestras ambientales (incluyendo, pero sin limitación, aire, muestras agrícolas, de agua y suelo); materiales vegetales; muestras de agentes de guerra biológica; muestras de investigación (por ejemplo, la muestra puede ser el producto de una reacción de amplificación, por ejemplo amplificación general de ADN genómico); muestras purificadas, tales como ADN genómico, ARN, proteínas, etc. purificados; muestras brutas (bacterias, virus, ADN genómico, etc.); como se apreciará por los especialistas en la materia, puede realizarse prácticamente cualquier manipulación experimental en la muestra. Algunas realizaciones utilizan ARNip y microARN como secuencias diana (Zhang *et al.*, *J. Cell. Physiol.* (2007) 210(2): 279-89; Osada *et al.*, *Carcinogenesis*. (2007) 28(1): 2-12; y Mattes *et al.*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* (2007) 36(1): 8-12).

Algunas realizaciones de la invención utilizan muestras de ácido nucleico de tejidos archivados (por ejemplo, congelados y/o archivados) o frescos. Las muestras embebidas en parafina son de uso particular en muchas realizaciones, ya que estas muestras pueden ser muy útiles debido a la presencia de datos adicionales asociados a las muestras, tales como diagnóstico y pronóstico. Las muestras de tejido fijadas y embebidas en parafina como se describe en la presente memoria hacen referencia a muestras de tejido almacenables o de archivo. La mayoría de muestras patológicas derivadas de pacientes se fijan rutinariamente y se embeben en parafina para permitir un análisis histológico y el posterior almacenamiento en archivo. Dichas muestras a menudo no son útiles para métodos tradicionales de detección de ácido nucleico porque dichos estudios requieren una alta integridad de la muestra de ácido nucleico para que pueda realizarse una medida exacta de la expresión de ácido nucleico. A menudo, los estudios de expresión génica en muestras embebidas en parafina están limitados a la monitorización cualitativa usando tinción inmunohistoquímica para monitorizar los niveles de expresión de proteína.

Los métodos de la presente invención son útiles en la detección de ácidos nucleicos de muestras embebidas en parafina porque el proceso de fijar y embeber en parafina a menudo da como resultado la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras. La presente invención puede amplificar y detectar incluso muestras degradadas, tales como aquellas encontradas en muestras embebidas en parafina.

Existen una serie de técnicas para la purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras embebidas en parafina como se describe en el documento WO 2007/133703.

Los analitos diana son ácidos nucleicos. Se entiende en la presente memoria por "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en la presente memoria al menos dos nucleótidos ligados covalentemente entre sí. Un

ácido nucleico de la presente invención contendrá generalmente enlaces fosfodiéster (por ejemplo, en el caso de las secuencias diana), aunque en algunos casos, como se esboza a continuación, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternativos (particularmente para uso con las sondas de ligamiento), que comprenden por ejemplo fosforamida (Beaucage *et al.*, Tetrahedron (1993) 49(10): 1925 y referencias en la misma; Letsinger, *J. Org. Chem.* (1970) 35: 3800; Sprinzi *et al.*, Eur. J. Biochem. (1977) 81: 579; Letsinger *et al.*, Nucl. Acids Res. (1986) 14: 3487; Sawai *et al.*, Chem. Lett. (1984) 805; Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1988) 110: 4470 y Pauwels *et al.*, Chemica Scripta (1986) 26: 141), fosforotioato (Mag *et al.*, Nucleic Acids Res. (1991) 19: 1437 y la patente de EE.UU. n° 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1989) 111: 2321, ligamientos de O-metilfosforamidita (véase Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach", Oxford University Press), y esqueletos y ligamientos de ácido nucleico peptídico (véase Egholm, J. Am. Chem. Soc. (1992) 114: 1895; Meier *et al.*, Chem. Int. Ed. Engl. (1992) 31: 1008; Nielsen, Nature, (1993) 365: 566; Carlsson *et al.*, Nature (1996) 380: 207). Otros análogos de ácido nucleico incluyen aquellos con estructuras bicíclicas incluyendo ácidos nucleicos bloqueados, Koshkin *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1998) 120: 13252 3); esqueletos positivos (Denpey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 6097; esqueletos no iónicos (patentes de EE.UU. n° 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowski *et al.*, Angew. Chem. Intl. Ed. English (1991) 30: 423; Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1988) 110: 4470; Letsinger *et al.*, Nucleoside & Nucleotide (1994) 13: 1597; capítulos 2 y 3 de ASC Symposium Series 580, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. (1994) 4: 395 ; Jeffs *et al.*, J. Biomolecular NMR (1994) 34: 17; Xu *et al.*, Tetrahedron Lett. (1996) 37: 743) y esqueletos no de ribosa, incluyendo aquellos descritos en las patentes de EE.UU. n° 5.235.033 y 5.034.506, y los capítulos 6 y 7 de ASC Symposium Series 580, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Se incluyen también en la definición de ácidos nucleicos ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos (véase Jenkins *et al.*, Chem. Soc. Rev. (1995) pág. 169-176). Se describen varios análogos de ácido nucleico en Rawls, C & E News 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de marcadores u otros restos, para aumentar o reducir la estabilidad y semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos, etc.

Como se apreciará por los especialistas en la materia, todos estos análogos de ácido nucleico pueden encontrar uso en la presente invención. Además, pueden realizarse mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos; por ejemplo, en el sitio de un resto de ligamiento, puede usarse una estructura de análogo. Como alternativa, pueden realizarse mezclas de diferentes análogos de ácido nucleico y mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos.

Los análogos de ácido nucleico pueden incluir, por ejemplo, ácido nucleico peptídico (ANP, documento WO 92/20702) y ácido nucleico bloqueado (ANB, Koshkin AA *et al.* Tetrahedron (1998) 54: 3607-3630, Koshkin AA *et al.* J. Am. Chem. Soc. (1998) 120: 13252-13253, Wahlestedt C *et al.* PNAS (2000) 97: 5633-5638). En algunas aplicaciones, los esqueletos de análogos de este tipo pueden exhibir una cinética de hibridación mejorada, una estabilidad térmica mejorada y una sensibilidad mejorada a secuencias desapareadas.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, como se especifica, o contener porciones tanto de secuencias bicatenarias como monocatenarias. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, en que el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos y cualquier combinación de bases, incluyendo nucleobases de origen natural (uracilo, adenina, timina, citosina, guanina) y nucleobases de origen no natural (inosina, xantina hipoxantina, isocitosina, isoguanina, 5-metilcitosina, seudoisocitosina, 2-tiouracilo y 2-tiotimina, 2-aminopurina, N9-(2-amino-6-cloropurina), N9-(2,6-diaminopurina), hipoxantina, N9-(7-desazaguanina), N9-(7-desaza-8-azaguanina) y N8-(7-desaza-8-azaadenina), 5-propiniluracilo, 2-tio-5-propiniluracilo), etc. Como se usa en la presente memoria, el término "nucleobase" incluye tanto "nucleósidos" como "nucleótidos" y monómeros de análogos de ácido nucleico. Por tanto, por ejemplo, se hace referencia en la presente memoria a las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico, que contienen cada una una base, como una nucleobase.

En un aspecto, las sondas de ligamiento de la invención son cualquier especie polimérica que sea capaz de interactuar con una diana o dianas de ácido nucleico de manera específica de secuencia y que posea restos químicos que permitan que las sondas experimenten una reacción de ligamiento química espontánea con otra especie polimérica que posea restos químicos complementarios. En una realización, las sondas oligonucleotídicas pueden ser de ADN, ARN, ANP, ANB, versiones modificadas de los anteriormente mencionados y/o cualquier híbrido de los mismos (por ejemplo, híbridos de ADN/ARN, híbridos de ADN/ANB, híbridos de ADN/ANP). En una realización preferida, las sondas oligonucleotídicas son oligonucleótidos de ADN o ARN.

Las muestras de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias diana) que no existen en estado monocatenario en la región de la secuencia o secuencias diana se vuelven generalmente monocatenarias en dicha región o regiones antes de la detección o hibridación. Generalmente, las muestras de ácido nucleico pueden volverse monocatenarias en la región de la secuencia diana usando desnaturalización térmica. Para polinucleótidos obtenidos mediante amplificación, se prefieren métodos adecuados para generar productos de amplificación monocatenarios. Los ejemplos no limitantes de procesos de amplificación adecuados para generar polinucleótidos productos de amplificación monocatenarios incluyen, pero sin limitación, transcripción con separación por ARN polimerasa de T7, RCA, PCR asimétrica (Bachmann *et al.*, Nucleic Acid Res. (1990) 18: 1309) y PCR asincrónica (documento WO 01/94638). Pueden usarse también métodos conocidos comúnmente para volver monocatenarias regiones

bicatenarias de polinucleótidos, tal como el uso de abridores de ANP (patente de EE.UU. nº 6.265.166), para generar secuencias diana monocatenarias en un polinucleótido.

En un aspecto, la invención proporciona métodos de detección de secuencias diana. "Secuencia diana" o "ácido nucleico diana" o equivalentes gramaticales significan en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico en una sola hebra de ácido nucleico. La secuencia diana puede ser una porción de un gen, una secuencia reguladora, ADN genómico, ADNc, ARN incluyendo ARNm, microARN y ARNr, u otros. Como se esboza en la presente memoria, la secuencia diana puede ser una secuencia diana de una muestra o una diana secundaria tal como un producto de una reacción de amplificación, etc. Puede ser de cualquier longitud, entendiendo que las secuencias más largas son más específicas. Como se apreciará por los especialistas en la materia, la secuencia diana complementaria puede tomar muchas formas. Por ejemplo, puede estar contenida en una secuencia de ácido nucleico mayor, concretamente todo o parte de un gen o ARNm, un fragmento de restricción de un plásmido o ADN genómico, entre otros.

En algunas realizaciones, la secuencia diana consta de diferentes tipos de dominios diana. Por ejemplo, un primer dominio diana de la secuencia diana de muestra puede hibridar con una primera sonda de ligamiento, y un segundo dominio diana en la secuencia diana puede hibridar con una segunda sonda de ligamiento. Otros dominios diana pueden hibridar con una sonda de captura en un sustrato tal como una matriz o una sonda de marcaje, etc.

Los dominios diana pueden estar adyacentes o separados como se indica, como se describe más completamente a continuación. En algunos casos, cuando la detección está basada en el ligamiento y la aplicación requiere la amplificación de señal, las sondas de ligamiento pueden utilizar ligadores y estar separadas por una o más nucleobases de la secuencia diana para conferir inestabilidad de hibridación al producto ligado. En otras aplicaciones, por ejemplo en la detección de polimorfismos mononucleotídicos (SNP), o en reacciones de transferencia, las sondas de ligamiento pueden hibridar con nucleobases adyacentes de la secuencia diana. A menos que se especifique, los términos "primero" y "segundo" no se pretende que confieran una orientación de las secuencias con respecto a la orientación 5'-3' de la secuencia diana. Por ejemplo, suponiendo una orientación 5'-3' de la secuencia diana complementaria, el primer dominio diana puede estar localizado en 5' al segundo dominio o en 3' al segundo dominio. Por facilidad de referencia y sin limitación, se hace referencia a veces a estos dominios como "en dirección 5'" y "en dirección 3'", siendo la convención normal que la secuencia diana se exhiba en orientación 5' a 3'

Las sondas se diseñan de tal modo que, cuando las sondas se unen a una parte del polinucleótido diana en proximidad espacial cercana, aparece una reacción de ligamiento químico entre las sondas. En general, las sondas comprenden restos químicamente reactivos (a los que se hace referencia en la presente memoria en general como "restos de ligamiento") y se unen al polinucleótido diana en una orientación particular, de tal modo que los restos químicamente reactivos entren en una proximidad espacial cercana, dando por tanto como resultado una reacción de ligamiento espontánea.

Componentes de sonda

En un aspecto, la divulgación proporciona conjuntos de sondas de ligamiento, habitualmente una primera y una segunda sondas de ligamiento, aunque como se describe en la presente memoria algunas realizaciones utilizan más de dos. Además, como se observa en la presente memoria, en algunos casos se realiza una reacción de transferencia en lugar de ligamiento; las "sondas de ligamiento" incluyen "sondas de transferencia". Cada sonda de ligamiento comprende una porción de ácido nucleico, a la que se hace referencia a veces en la presente memoria como un "dominio de sonda", que es sustancialmente complementaria de uno de los dominios diana. Las sondas de la presente divulgación se diseñan para ser complementarias de una secuencia diana de tal modo que ocurra hibridación de la secuencia diana y de las sondas de la presente invención. Como se esboza en la presente memoria, esta complementariedad no tiene que ser perfecta; puede haber cualquier número de desapareamientos de pares de bases que interferirán con la hibridación entre la secuencia diana y las sondas de la presente divulgación. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no ocurre hibridación siquiera en las condiciones menos rigurosas de hibridación, la secuencia no es una secuencia complementaria. Por tanto, se entiende en la presente memoria por "sustancialmente complementario" que las sondas sean suficientemente complementarias de las secuencias diana para hibridar en condiciones normales de reacción. Son secuencias "idénticas" aquellas en que existe una complementariedad perfecta a lo largo de la secuencia más corta de nucleobases.

En un aspecto, la longitud de la sonda se diseña para variar con la longitud de la secuencia diana, la especificidad requerida, la reacción (por ejemplo, ligamiento o transferencia) y las condiciones de hibridación y lavado. Generalmente, en este aspecto las sondas de ligamiento oscilan de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 nucleobases, prefiriéndose de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 y prefiriéndose especialmente de aproximadamente 25 a aproximadamente 75. En general, estas longitudes se aplican igualmente a sondas de ligamiento y transferencia.

En los métodos de la invención, a los que se hace referencia en la presente memoria como "CLPA-CE", que se describen más completamente a continuación, la longitud de sonda se diseña para variar con cada diana de interés, generando así productos de ligamiento que pueden identificarse y analizarse basándose en la diferencia de longitud.

5 Puede usarse una variedad de condiciones de hibridación en la presente invención, incluyendo condiciones de alto, moderado y bajo rigor; véanse, por ejemplo, Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, 1989, y Ausubel, *et al.*, "Short Protocols in Molecular Biology", incorporados a la presente memoria como referencia. Las condiciones de hibridación pueden variar también cuando se usa un esqueleto no iónico, por ejemplo ANP, como es conocido en la materia.

Restos de ligamiento

10 Además de los dominios de ligamiento, las sondas de ligamiento de la invención tienen restos de ligamiento. Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a métodos de ligamiento químico que incluyen la unión de al menos una primera y una segunda sondas de ligamiento al ácido nucleico diana, formando un "sustrato de ligamiento", en condiciones tales que los restos de ligamiento de la primera y segunda sondas de ligamiento sean capaces de reaccionar espontáneamente, ligando conjuntamente las sondas, en ausencia de ligasa exógena; es decir, no se añade ligasa exógena a la reacción. En el caso de la reacción de transferencia, puede hacerse referencia a esto como "sustrato de ligamiento" o "sustrato de transferencia". Se entiende en la presente memoria por "sustrato de ligamiento" un sustrato para ligamiento químico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico diana y dos o más sondas de ligamiento. De forma similar, se incluye en la definición de "sustrato de ligamiento" un "sustrato de transferencia", que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico diana y dos o más sondas de transferencia.

En algunas realizaciones de la invención, por ejemplo cuando se desea una especificidad adicional, pueden usarse más de dos sondas de ligamiento. En esta realización, la sonda o sondas "medias" pueden estar también adyacentes a o separadas por una o más nucleobases de la secuencia diana. En una realización preferida, la reacción de ligamiento no requiere la presencia de una enzima ligasa y ocurre espontáneamente entre las sondas unidas en ausencia de cualquier ligasa de adición (por ejemplo, exógena).

Las sondas oligonucleotídicas de la divulgación se diseñan para ser específicas de la diana polinucleotídica. Estas sondas se unen a la diana en proximidad espacial cercana entre sí y están orientadas de tal manera que los restos químicamente reactivos están en proximidad espacial cercana. En un aspecto, se diseñan dos o más sondas para unirse cerca de sitios adyacentes en un polinucleótido diana. En una realización preferida, se unen dos sondas a la diana de tal modo que el resto de ligamiento en el extremo 5' de una sonda oligonucleotídica pueda interactuar con el resto de ligamiento en el extremo 3' de la otra sonda.

El ligamiento químico puede ocurrir espontáneamente, en condiciones apropiadas, sin la adición de ningún reactivo activador ni estímulo adicional. Como alternativa, pueden usarse agentes "activadores" o estímulos externos para promover la reacción de ligamiento químico. Los ejemplos de agentes activadores incluyen, sin limitación, carbodiimida, bromuro de cianógeno (BrCN), imidazol, 1-metilimidazol/carbodiimida/cistamina, *N*-cianoimidazol, ditiotreitól (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y otros agentes reductores, así como estímulos externos como luz ultravioleta, calor y/o cambios de presión.

Como se esboza en la presente memoria, los restos de ligamiento de los métodos reivindicados pueden tomar una variedad de configuraciones, dependiendo de una serie de factores. La mayoría de las químicas expuestas en la presente memoria se usan en reacciones de fosforamidita que progresan generalmente en dirección 3' a 5'. Es decir, la resina contiene una química que permite el enlazamiento de fosforamiditas en el extremo 5' de la molécula. Sin embargo, como es conocido en la materia, las fosforamiditas pueden usarse para progresar en dirección 5' a 3'; por tanto, la divulgación incluye restos de orientación opuesta a los esbozados en la presente memoria.

45 Cada conjunto de sondas de ligamiento (o sondas de transferencia) contiene un conjunto de un primer resto de ligamiento y un segundo resto de ligamiento. La identificación de estos pares de restos de ligamiento depende de la química del ligamiento para usar. Además, como se describe en la presente memoria, pueden estar presentes ligadores (incluyendo, pero sin limitación, ligadores de desestabilización) entre el dominio de sonda y el resto de ligamiento de una o ambas sondas de ligamiento. En general, por facilidad de discusión, la descripción de la presente memoria puede usar los términos sondas de ligamiento "en dirección 5'" y "en dirección 3'", aunque no se pretende que esto sea limitante.

Química del grupo saliente halógeno

En una realización de la invención, la química está basada en la tecnología del grupo saliente 5'-halógeno tal como se describe en general en Gryanov, S.M. y Letsinger, R.L., (1993) Nucleic Acids Research, 21: 1403; Xu, Y. y Kool, E.T. (1997) Tetrahedron Letters 38: 5595; Xu, Y. y Kool, E.T., (1999) Nucleic Acids Research 27: 875; Arar *et al.*, (1995), BioConj. Chem., 6: 573; Kool, E. T. *et al.*, (2001) Nature Biotechnol. 19: 148; Kool, E. T. *et al.*, (1995) Nucleic Acids Res. 23(17): 3547; Letsinger *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.476.930; Shouten *et al.*, patente de EE.UU. nº 6.955.901; Andersen *et al.*, patente de EE.UU. nº 7.153.658. En esta realización, la primera sonda de ligamiento incluye en su extremo 5' un nucleósido que tiene un grupo saliente 5', y la segunda sonda de ligamiento incluye en

su extremo 3' un nucleósido que tiene un grupo nucleófilo 3' tal como 3'-tiofosforilo. El grupo saliente 5' puede incluir muchos grupos salientes comunes conocidos por los especialistas en la materia incluyendo, por ejemplo, las especies halogenadas (I, Br, Cl) y grupos tales como los descritos por Abe y Kool, *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126: 13980-13986. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la primera sonda de ligamiento
 5 tiene un grupo saliente 5' enlazado a través de un ligador flexible y un oligonucleótido en dirección 3' que tiene un grupo 3'-tiofosforilo. Esta configuración conduce a un aumento significativo de la velocidad de reacción y da como resultado la producción de múltiples copias de producto ligado por cada diana.

El oligonucleótido "en dirección 5'", definido con relación a la dirección 5' a 3' del molde polinucleotídico como el oligonucleótido que se une al lado "en dirección 5'" (concretamente el lado izquierdo o 5') del molde, incluye, como
 10 su extremo 5', un grupo saliente 5'. Puede utilizarse cualquier grupo saliente capaz de participar en una reacción de SN2 que implique azufre, selenio o telurio como nucleófilo. El grupo saliente es un átomo o grupo enlazado con carbono de tal modo que, tras ataque nucleófilo del átomo de carbono por el nucleófilo (azufre, selenio o telurio) del grupo fosforilo modificado, el grupo saliente sale en forma de anión. Los grupos salientes adecuados incluyen, pero sin limitación, un haluro tal como yoduro, bromuro o cloruro, un tosilato, bencenosulfonato o éster p-nitrofenílico, así
 15 como RSO₃ en que R es fenilo o fenilo sustituido con 1 a 5 átomos o grupos que comprenden F, Cl, Br, I, alquilo (C1 a C6), nitro, ciano, sulfonilo y carbonilo, o R es alquilo de 1 a 6 carbonos. El grupo saliente es preferiblemente un yoduro, y el nucleósido en el extremo 5' del oligonucleótido en dirección 5' es, en el caso de ADN, un 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxinucleósido. Los ejemplos de 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxinucleósidos adecuados incluyen, pero sin limitación, 5'-desoxi-5'-yodotimidina (5'-I-T), 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxicidina (5'-I-dC), 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxiadenosina (5'-I-dA), 5'-desoxi-5'-yodo-3'-desaza-2'-desoxiadenosina (5'-I-3-desaza-dA), 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxiguanosina (5'-I-dG) y 5'-desoxi-5'-yodo-3'-desaza-2'-desoxiguanosina (5'-I-3-desaza-dG), y los derivados de fosforamidita de los mismos (véase la FIG. 2). En el caso de oligonucleótidos de ARN, los ejemplos de análogos de 5'-desoxi-5'-yodonucleósidos adecuados incluyen, pero sin limitación, 5'-desoxi-5'-yodouracilo (5'-I-U), 5'-desoxi-5'-yodocitidina (5'-I-C), 5'-desoxi-5'-yoadenosina (5'-I-A), 5'-desoxi-5'-yodo-3'-desazadenosina (5'-I-3-desaza-A), 5'-desoxi-5'-yodoguanosina (5'-I-G) y 5'-desoxi-5'-yodo-3'-desazaguanosina (5'-I-3-desaza-G), y los derivados de fosforamidita de los mismos. En una realización preferida, una sonda de ligamiento en dirección 5' contiene 2'-desoxirribonucleótidos, excepto porque el nucleótido modificado en el extremo 5', que comprende el grupo saliente 5', es un ribonucleótido. Esta realización del nucleótido en dirección 5' es ventajosa porque el enlace entre el penúltimo 2'-desoxirribonucleótido y el ribonucleótido 5' terminal es susceptible de escisión usando base. Esto
 20 permite la reutilización potencial de una sonda oligonucleotídica que está, por ejemplo, unida a un soporte sólido, como se describe con más detalle a continuación. Con referencia al ensayo de CLPA, que se describe más completamente a continuación, el grupo saliente 5' de la sonda "en dirección 5'" es lo más preferiblemente dabsilo.

El oligonucleótido "en dirección 3'", que se une al molde polinucleotídico "en dirección 3'", concretamente en 3' del oligonucleótido en dirección 5', incluye en su extremo 3' un nucleósido que tiene ligado con su 3'-hidroxilo un grupo
 35 fosforotioato (concretamente un grupo "3'-fosforotioato"), un grupo fosfoseleniato (concretamente un grupo "3'-fosfoseleniato") o un grupo fosfortelurato (concretamente, un "grupo 3'-fosfortelurato"). Las químicas usadas para autoligamiento están por tanto mediadas por azufre, mediadas por selenio o mediadas por telurio. El autoligamiento proporciona un producto de ligamiento que contiene un fosforotioéster de puente 5' (--O--P(O)(O)--S-), un fosfoselenioéster (-O--P(O)(O)--Se-) o un fosforteluroéster (-O--P(O)(O)--Te-), como prescribe el grupo que comprende el extremo 3' del oligonucleótido en dirección 3'. Este diéster de puente aquiral no natural está colocado entre dos nucleótidos adyacentes y toma el lugar de un fosfodiéster de puente 5' de origen natural. Sorprendentemente, el ligamiento mediado por selenio es de 3 a 4 veces más rápido que el ligamiento mediado por azufre, y el producto de ligamiento que contiene selenio era muy estable, a pesar de la menor fuerza de enlace del enlace Se-P. Adicionalmente, se espera que el fosfoselenioéster de puente, así como el fosforteluroéster de puente, sean escindibles selectivamente por iones de plata o mercurícos en condiciones muy suaves (véase Mag et al., *Nucleic Acids Res.* (1991) 19: 1437 1441).

En una realización, un oligonucleótido en dirección 3' contiene 2'-desoxirribonucleótidos, excepto porque el nucleótido modificado en el extremo 3', que comprende el fosforotioato, fosfoseleniato o fosfortelurato 3', es un ribonucleótido. Esta realización del nucleótido en dirección 5' es ventajosa porque el enlace entre el penúltimo 2'-desoxirribonucleótido y el ribonucleótido terminal es susceptible de escisión usando base, permitiendo la reutilización potencial de una sonda oligonucleotídica que está, por ejemplo, unida a un soporte sólido. Con referencia al ensayo de CLPA, como se describe más completamente a continuación, la sonda "en dirección 3'" incluye lo más preferiblemente en su extremo 3' 3'-fosforotioato.

Debería observarse que los oligonucleótidos "en dirección 5'" y "en dirección 3'" pueden constituir, opcionalmente,
 55 los dos extremos de un solo oligonucleótido, en cuyo caso el ligamiento proporciona un producto de ligamiento circular. Las regiones de unión en los extremos 5' y 3' del oligonucleótido precursor lineal deben ligarse por una serie de nucleótidos intermedios suficiente para permitir la unión de las regiones de unión 5' y 3' a la diana polinucleotídica.

Las composiciones proporcionadas por la invención incluyen un 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxinucleósido, por ejemplo, una 5'-desoxi-5'-yodotimidina (5'-I-T), 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxicidina (5'-I-dC), 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxiadenosina (5'-I-dA), 5'-desoxi-5'-yodo-3'-desaza-2'-desoxiadenosina (5'-I-3-desaza-dA), 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxiguanosina (5'-I-dG) y 5'-desoxi-5'-yodo-3'-desaza-2'-desoxiguanosina (5'-I-3-desaza-dG), y los derivados de

fosforamidita de los mismos, así como un oligonucleótido que comprende, como su extremo 5', un 5'-desoxi-5'-yodo-2'-desoxinucleósido de la invención. Las composiciones proporcionadas por la invención incluyen adicionalmente un 5'-desoxi-5'-yodonucleósido tal como 5'-desoxi-5'-yodouracilo (5'-I-U), 5'-desoxi-5'-yodocitidina (5'-I-C), 5'-desoxi-5'-yodoadenosina (5'-I-A), 5'-desoxi-5'-yodo-3-desazadenosina (5'-I-3-desaza-A), 5'-desoxi-5'-yodoguanosina (5'-I-G) y 5'-desoxi-5'-yodo-3-desazaguanosina (5'-I-3-desaza-G), y los derivados de fosforamidita de los mismos, así como un oligonucleótido que comprende, como su extremo 5', un 5'-desoxi-5'-yodonucleósido de la invención. Se incluye también en la invención un nucleósido que comprende un grupo 3'-fosforoseleniato o un grupo 3'-fosforoseleniato o un oligonucleótido que comprende como su extremo 3' un nucleósido que comprende un grupo 3'-fosforoseleniato o un grupo 3'-fosforotelurato. Están también incluidos en la invención oligonucleótidos que contienen cualquiera o ambas de estas clases de nucleósidos modificados ya que son métodos de preparación de diversos nucleósidos y oligonucleótidos. Los oligonucleótidos que están modificados en cualquiera o ambos de los extremos 5' o 3' de acuerdo con la invención incluyen opcionalmente, pero no necesariamente, un marcador detectable, preferiblemente un radiomarcador, un grupo donante o aceptor de energía de fluorescencia, un marcador de excímeros o cualquier combinación de los mismos.

Además, en algunos casos, los grupos sustituyentes pueden ser también grupos protectores (a los que a veces se hace referencia en la presente memoria como "PG"). Los grupos protectores adecuados dependerán del átomo para proteger y de las condiciones a que esté expuesto el resto. Son conocidos una amplia variedad de grupos protectores; por ejemplo, se usa frecuentemente DMT como grupo protector en la química de la fosforamidita (como se expone en la figuras; sin embargo, el DMT puede reemplazarse por otros grupos protectores en estas realizaciones. Son adecuados una amplia variedad de grupos protectores; véase, por ejemplo, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", incorporado a la presente memoria como referencia para grupos protectores y química asociada.

Se entiende en la presente memoria por "grupo alquilo" o equivalentes gramaticales un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada, prefiriéndose grupos alquilo de cadena lineal. Si está ramificado, puede estar ramificado en una o más posiciones, y a menos que se especifique, en cualquier posición. El grupo alquilo puede oscilar de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono (C1-C30), utilizando una realización preferida de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (C1-C20), prefiriéndose de aproximadamente C1 a aproximadamente C12 a aproximadamente C15 y prefiriéndose particularmente de C1 a C5, aunque en algunas realizaciones el grupo alquilo puede ser mucho mayor. Se incluye también en la definición de grupo alquilo los grupos cicloalquilo tales como anillos de C5 y C6, y anillos heterocíclicos con nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. Alquilo incluye también heteroalquilo, prefiriéndose heteroátomos de azufre, oxígeno, nitrógeno y silicio. Alquilo incluye grupos alquilo sustituidos. Se entiende en la presente memoria por "grupo alquilo sustituido" un grupo alquilo que comprende adicionalmente uno o más restos de sustitución "R" como se definen anteriormente.

Se entiende en la presente memoria por "grupos amino" o equivalentes gramaticales de los mismos grupos NH_2 , -NHR y $-\text{NR}_2$, siendo R como se define en la presente memoria. En algunas realizaciones, por ejemplo en el caso de reacciones de ligamiento de péptidos, encuentran particular uso las aminas primarias y secundarias, mostrando las aminas primarias generalmente velocidades de reacción más rápidas.

Se entiende en la presente memoria por "grupo nitro" un grupo $-\text{NO}_2$.

Se entiende en la presente memoria por "restos que contienen azufre" compuestos que contienen átomos de azufre incluyendo, pero sin limitación, compuestos de grupos tia, tio y sulfo, tioles ($-\text{SH}$ y $-\text{SR}$) y sulfuros ($-\text{RSR}$). Es un tipo particular de resto que contiene azufre el tioéster ($-(\text{CO})-\text{S}$), habitualmente encontrado como tioéster sustituido ($-(\text{CO})-\text{SR}$). Se entiende en la presente memoria por "restos que contienen fósforo" compuestos que contienen fósforo incluyendo, pero sin limitación, fosfinas y fosfatos. Se entiende en la presente memoria por "restos que contienen silicio" compuestos que contienen silicio.

Se entiende en la presente memoria por "éter" un grupo $-\text{O}-\text{R}$. Los éteres preferidos incluyen grupos alcoxilo, prefiriéndose $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ y $-\text{O}-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$.

Se entiende en la presente memoria por "éster" un grupo $-\text{COOR}$.

Se entiende en la presente memoria por "halógeno" bromo, yodo, cloro o flúor. Los alquilos sustituidos preferidos son alquilos parcial o totalmente halogenados tales como CF_3 , etc.

Se entiende en la presente memoria por "aldehído" grupos $-\text{RCOH}$.

Se entiende en la presente memoria por "alcohol" grupos $-\text{OH}$ y grupo alquilo $-\text{ROH}$.

Se entiende en la presente memoria por "amido" grupos $-\text{RCONH}$ - o RCONR -.

Se entiende en la presente memoria por "etilenglicol" un grupo $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$, aunque cada carbono del grupo etileno puede estar también sustituido una o dos veces, concretamente $-(\text{O}-\text{CR}_2-\text{CR}_2)_n-$, con R como se describe anteriormente. Se prefieren también derivados de etilenglicol con otros heteroátomos en lugar de oxígeno (concretamente, $-(\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ o $-(\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$, o con grupos de sustitución).

Adicionalmente, en algunas realizaciones el grupo R puede ser un grupo funcional, incluyendo inactivadores, restos de desestabilización y fluoróforos (como se definen a continuación). Los fluoróforos de uso particular en esta realización incluyen, pero sin limitación, fluoresceína y sus derivados, TAMRA (tetrametil-6-carboxirrodamina), tintes Alexa y tintes de cianina (por ejemplo Cy3 y Cy5).

- 5 Los restos o moléculas inactivadores son conocidos en la materia, y son generalmente compuestos aromáticos de múltiples anillos que pueden desactivar el estado excitado de otra molécula. Los pares de fluoróforo-inactivador son bien conocidos en la materia. Los restos inactivadores adecuados incluyen, pero sin limitación, dabsilo (dimetilamino(azobenceno)sulfonilo), dabculo (dimetilamino(azobenceno)carbonilo), inactivadores Eclipse (catálogo de Glen Research) e inactivadores de agujero negro (BHQ-1, BHQ-2 y BHQ-3) de Biosearch Technologies.
- 10 Los restos de desestabilización adecuados se discuten a continuación e incluyen, pero sin limitación, entidades moleculares que dan como resultado una reducción de la energía de unión global de un oligonucleótido a su sitio diana. Los ejemplos potenciales incluyen, pero sin limitación, cadenas alquilo, complejos cargados y estructuras de anillo.

Restos de ligamiento nucleófilos

- 15 En esta realización, la otra sonda de ligamiento comprende un resto de ligamiento que comprende un nucleófilo tal como una amina. Los restos de ligamiento que comprenden tanto un tiol como una amina encuentran uso particular en ciertas reacciones. En general, los restos de ligamiento nucleófilos pueden incluir una amplia variedad de compuestos de aminotiol potenciales, a condición de que el resto de ligamiento nucleófilo contenga un grupo tiol que está proximal a un amino primario o secundario y que la colocación relativa sea tal que pueda conseguirse al menos un estado de transición de 5 o 6 anillos durante el desplazamiento de acilo de S a N.
- 20

- Por consiguiente, las moléculas de ligamiento nucleófilas que comprenden grupos 1,2- o 1,3-aminotiol encuentran uso particular. Las aminas primarias encuentran uso en algunas realizaciones cuando el tiempo de reacción es importante, ya que el tiempo de reacción es generalmente más rápido que en aminas secundarias, aunque las aminas secundarias encuentran uso en reacciones de acil transferasa que contribuyen a la desestabilización como se discute a continuación. Los carbonos entre los grupos amino y tiol pueden estar sustituidos por grupos R no de hidrógeno, aunque generalmente se utiliza solo un grupo R no de hidrógeno por carbono. Adicionalmente, los grupos R adyacentes (expuestos como R' y R'' en la Figura *CC) pueden unirse conjuntamente formando estructuras cíclicas, incluyendo grupos cicloalquilo y arilo sustituidos y no sustituidos, incluyendo heterocicloalquilo y heteroarilo y los derivados sustituidos y no sustituidos de los mismos. En el caso de usar un grupo 1,2-aminotiol y de que estén enlazados grupos R adyacentes, se prefiere generalmente que los grupos R adyacentes formen grupos cicloalquilo (incluyendo heterocicloalquilo y derivados sustituidos del mismo) en lugar de grupos arilo.
- 25
- 30

En esta realización, para la generación de la contracción del enlace 4 sigma de la cadena para desestabilización, el resto de ligamiento de reemplazo se basa en una reacción de acil transferasa.

Ligadores

- 35 En muchas realizaciones pueden incluirse opcionalmente ligadores (a veces mostrados en la presente memoria como "L" o "L_n-(ligador)_n"), (en que n es 0 o 1) en una variedad de posiciones en la sonda o sondas de ligamiento. Los ligadores adecuados incluyen grupos alquilo y arilo, incluyendo heteroalquilo y heteroarilo, y derivados sustituidos de estos. En algunos casos, por ejemplo cuando se realizan reacciones de ligamiento de péptido nativo, los ligadores pueden estar basados en aminoácidos y/o contener conexiones amida. Como se describe en la presente memoria,
- 40 algunos ligadores permiten separar las sondas de ligamiento por una o más nucleobases, formando sitios básicos en el producto de ligamiento que sirven como restos de desestabilización, como se describe a continuación.

Restos de desestabilización

- De acuerdo con un aspecto de la invención, es deseable producir múltiples copias de producto ligado para cada molécula diana sin la ayuda de una enzima. Un modo de conseguir este objetivo implica la disociación del producto ligado de la diana después de la reacción de ligamiento químico, permitiendo que un nuevo conjunto de sondas se una a la diana. Para aumentar la renovación de producto de ligamiento, son deseables diseños de sonda, instrumentación y químicas de reacción de ligamiento químico que aumenten la disociación de producto de la molécula diana.
- 45

- Trabajos previos han mostrado que un modo de conseguir la disociación de producto y aumentar la renovación de producto es "termociclar" la mezcla de reacción. El termociclado es el proceso de variar la temperatura de una reacción para facilitar el resultado deseado. Lo más a menudo, el termociclado toma la forma de una elevación breve de la temperatura de la mezcla de reacción de modo que la temperatura de reacción esté por encima de la temperatura de fusión del producto ligado durante un breve periodo de tiempo, causando que el producto se disocie de la diana. Tras el enfriamiento, puede unirse a la diana un nuevo conjunto de sondas y experimentar otra reacción de ligamiento. Este procedimiento de termociclado se ha practicado extensamente para reacciones enzimáticas como PCR.
- 50
- 55

Aunque el termociclado es un modo de conseguir la renovación de producto, es posible diseñar sondas de tal modo que exista una renovación de producto significativa sin termociclado. Los diseños de sonda y químicas de ligamiento que ayudan a reducir la temperatura de fusión del producto ligado aumentan la renovación de producto al reducir la inhibición de producto del ciclo de reacción.

5 Por consiguiente, en un aspecto, las sondas se diseñan para incluir elementos (por ejemplo restos de desestabilización) que, tras el ligamiento de las sondas, sirvan para desestabilizar la hibridación del producto de ligamiento con la secuencia diana. Como resultado, el sustrato ligado se disocia después del ligamiento, dando como resultado una renovación del producto de ligamiento, por ejemplo, el producto de ligamiento que comprende las dos sondas de ligamiento se deshibrida de la secuencia diana, liberando la secuencia diana para hibridación con otro conjunto de sondas.

10 Además, aumentar la concentración de las sondas de ligamiento libres (por ejemplo, no hibridadas) puede ayudar también a conducir el equilibrio hacia la liberación de producto de ligamiento (o producto de transferencia) de la secuencia diana. Por consiguiente, algunas realizaciones de la invención usan concentraciones de sondas que son 1.000.000 veces mayores que la de la diana, mientras que en otras realizaciones las de las sondas son de 10.000 a 100 veces mayores que la de la diana. Como se apreciará por los especialistas en la materia, aumentar la concentración de sondas libres puede usarse por sí mismo o con cualquier realización esbozada en la presente memoria para conseguir renovación de producto (por ejemplo, amplificación). Aunque aumentar la concentración de sonda puede dar como resultado una renovación de producto aumentada, puede conducir también a reacciones secundarias significativas tales como hidrólisis de sonda y ligamiento no mediado por diana.

20 En un aspecto, los elementos de sonda incluyen estructuras que reducen la temperatura de fusión del producto ligado. En algunas realizaciones, los elementos de sonda se diseñan para hibridar con nucleobases diana no adyacentes, por ejemplo, existe un "hueco" entre las dos sondas hibridadas pero no ligadas. En general, esto se realiza usando uno o dos ligadores entre el dominio de sonda y el resto de ligamiento. Es decir, puede haber un ligador entre el primer dominio de sonda y el primer resto de ligamiento, uno entre el segundo dominio de sonda y el segundo resto de ligamiento, o ambos. En algunas realizaciones, el hueco comprende una sola nucleobase, aunque pueden utilizarse también más según se desee. Como se apreciará por los especialistas en la materia, puede haber una compensación entre la cinética de reacción y la longitud de los ligadores; si la longitud del ligador o ligadores es tan larga que el contacto que da como resultado ligamiento está cinéticamente desfavorecido, pueden desearse ligadores más cortos. Sin embargo, en algunos casos, cuando la cinética no es importante, la longitud del hueco y los ligantes resultantes pueden ser más largos, permitiendo huecos que cubren de 1 a 10 nucleobases. Generalmente, en esta realización, lo que es importante es que la longitud del ligador o ligadores corresponda aproximadamente al número de nucleobases en el hueco.

35 En otro aspecto de esta realización de la invención, la formación de sitios abásicos en un producto de ligamiento en comparación con la secuencia diana sirve para desestabilizar el dúplex. Por ejemplo, Abe y Kool (*J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126: 13980-13986) compararon la renovación cuando se ligaban dos sondas oligonucleotídicas de 8 unidades diferentes (Bu42 y DT40) con la misma sonda de 7 unidades (Thio 4). Cuando se liga Thio4 con DT40, se forma una sonda oligonucleotídica continua de 15 unidades con una estructura de ADN casi nativa que debería coincidir perfectamente con la diana de ADN. Sin embargo, cuando se liga Thio4 con Bu42, se forma una sonda oligonucleotídica de 15 unidades, pero cuando la sonda se une a la diana, tiene un sitio abásico en el medio que está cubierto por un ligador de alcano. La comparación de la temperatura de fusión (T_m) de estas dos sondas cuando se unen a la diana muestra una diferencia de aproximadamente 12 °C en la temperatura de fusión (58,5 para Bu42 frente a 70,7 °C para DT40). Esta diferencia de 12 °C en la temperatura de fusión conducía un aumento de aproximadamente 10 veces en la renovación de producto (91,6- Bu42 frente a 8,2 DT40) a 25 °C cuando los conjuntos de sonda (exceso de 10.000 veces, conc. 10 μ M) estaban presentes en gran exceso en comparación con la diana (1 nM). De forma similar, Dose *et al.* (Dose 2006) mostraron cómo una reducción de 4 °C en la T_m para dos secuencias idénticas, sondas de ANP ligadas químicamente (53 °C frente a 57 °C) da como resultado un aumento de aproximadamente 4 veces en la renovación de producto.

50 Trabajos recientes han demostrado el uso de sondas de autoligamiento inactivado (QUAL) basadas en ligamiento químico para monitorizar la expresión de ARN y para detectar desapareamientos de una base dentro de células bacterianas y humanas (documento WO 2004/0101011 incorporado a la presente memoria como referencia).

55 En una realización, los restos de desestabilización están basados en la retirada de restos de estabilización. Es decir, si una sonda de ligamiento contiene un resto que estabiliza su hibridación con la diana, tras el ligamiento y liberación del resto de estabilización, hay una caída de la estabilidad del producto de ligamiento. Por consiguiente, un esquema general para reducir la inhibición de producto es desarrollar sondas que liberen una entidad molecular como una molécula de unión al surco menor durante el transcurso de la reacción de ligamiento químico inicial o después de una reacción secundaria después del ligamiento. Dependiendo de la secuencia oligonucleotídica, las moléculas de unión al surco menor, como el tripéptido de dihidropirrolindol (DPI3) descrito por Kutayavin (Kutayavin 1997 y Kutayavin 2000), pueden aumentar la T_m de un ácido nucleico dúplex hasta 40 °C cuando se conjugan con el extremo de una sonda oligonucleotídica. En contraposición, la versión no enlazada de DPI3 aumenta solo la T_m del mismo dúplex en 2 °C o así. Por tanto, las moléculas de unión al surco menor pueden usarse para producir conjuntos de sondas con fuerzas de unión potenciadas, sin embargo si la molécula de unión al surco menor se libera

durante el transcurso de la reacción, se pierde la potenciación de la unión y el producto ligado exhibirá una T_m reducida respecto a sondas en que la molécula de unión al surco menor siga enlazada.

Las moléculas de unión al surco menor adecuadas incluyen, pero sin limitación, tripéptido de dihidropirrolindol (DPI3), distamicina A y pirrolimidazolpoliamidas (Gottesfeld, J.M., *et al.*, J. Mol. Biol. (2001) 309: 615-629.

- 5 Además de moléculas de unión al surco menor, los intercalantes anclados y moléculas relacionadas pueden aumentar significativamente también la temperatura de fusión de los dúplex oligonucleotídicos, y esta estabilización es significativamente menor en estado no anclado. (Dogan *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (2004) 126: 4762-4763 y Narayanan, *et al.*, Nucleic Acids Research, (2004) 32: 2901-2911).

- 10 De forma similar, como se apreciará por los especialistas en la materia, las sondas con fragmentos oligonucleotídicos enlazados (ADN, ANP, ANB, etc.) capaces de formar una triple hélice, pueden servir como restos de estabilización que, tras la liberación, dan como resultado una reducción de la estabilización del producto de ligamiento a la secuencia diana (Pooga, M, *et al.*, Biomolecular Engineering (2001) 17: 183-192.

- 15 Otro esquema general para reducir la inhibición de producto mediante la reducción de la fuerza de unión del producto ligado es incorporar sitios abásicos al punto de ligamiento. Este enfoque se ha demostrado anteriormente por Abe (J. Am. Chem. Soc. (2004) 126: 13980-13986), sin embargo, también es posible diseñar redistribuciones de sonda secundarias para amplificar adicionalmente la reducción de T_m forzando el alineamiento entre las sondas ligadas y la diana. Por ejemplo, Dose *et al.* (Org. Letters (2005) 7: 20 4365-4368) mostró cómo una redistribución después de ligamiento que cambiaba el espaciado entre las bases de ANP de los 12 enlaces sigma ideales a 13 daba como resultado una reducción de la T_m de 4 °C. Redistribuciones mayores y reacciones secundarias que interfieren con la unión del producto con la diana o dan como resultado la pérdida de bases oligonucleotídicas pueden reducir adicionalmente la T_m .

- 25 La presente invención proporciona métodos para una reacción de ligamiento que da como resultado una contracción de cadena de hasta 4 enlaces sigma durante la redistribución, lo que debería tener un efecto significativo sobre la T_m después de la redistribución en comparación con la expansión de 1 base usando la química descrita por Dose. Esta química está basada en el auxiliar de transferencia de acilo que se ha descrito anteriormente (Offer *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (2002) 124(17): 4642-6). Después de la terminación de la contracción de cadena, se genera un tiol libre que puede experimentar otra reacción con una molécula separada o consigo mismo. Por ejemplo, este tiol podría reaccionar con un tioéster interno retorciendo fuertemente el oligonucleótido y reduciendo por tanto adicionalmente la capacidad del producto de ligamiento de unirse a la diana.

- 30 Por tanto, en esta realización las reacciones de ligamiento que liberan grupos funcionales que experimentarán una segunda reacción con el producto de ligamiento pueden reducir la estabilización del híbrido de producto de ligamiento y secuencia diana.

Funcionalidades adicionales de las sondas de ligamiento

- 35 Además de los dominios diana, restos de ligamiento y ligadores opcionales, una o más de las sondas de ligamiento de la invención pueden tener funcionalidades adicionales incluyendo, pero sin limitación, secuencias promotoras y cebadoras (o complementos de las mismas, dependiendo del ensayo), marcadores que incluyen secuencias de unión a sonda de marcaje y secuencias de anclaje. Las funcionalidades adicionales, incluyendo secuencias espaciadoras variables (a las que se hace referencia también como secuencias de relleno), se describen a continuación en la presente memoria con referencia al ensayo de CLPA.

- 40 En un aspecto de la invención, la sonda oligonucleotídica en dirección 5' puede tener un sitio promotor o sitio de unión a cebador para una reacción de amplificación enzimática posterior. En una realización, la sonda en dirección 5' contiene la secuencia promotora de una ARN polimerasa, por ejemplo, T7, SP6 o T3. En otra realización, tanto los oligonucleótidos en dirección 5' como en 3' contienen secuencias de unión a cebador. Las secuencias promotoras y de unión a cebador se diseñan para no interactuar con las dianas de ácido nucleico en ninguna medida apreciable. En una realización preferida, cuando se detectan múltiples dianas simultáneamente, todos los conjuntos de sondas oligonucleotídicas en la reacción se diseñan para contener sitios de unión a promotor o par cebador idénticos de tal modo que, después de ligamiento y purificación, si es apropiado, todos los productos ligados puedan amplificarse simultáneamente usando la misma enzima y/o los mismos cebadores.

- 50 En una realización, una o más sondas de ligamiento comprenden una secuencia promotora. En realizaciones que emplean una secuencia promotora, la secuencia promotora o su complemento serán de longitud suficiente para permitir interactuar con ella a una polimerasa apropiada. Pueden encontrarse descripciones detalladas de secuencias que son suficientemente largas para interacción con polimerasa, entre otros sitios, en Sambrook y Russell. En ciertas realizaciones, los métodos de amplificación comprenden al menos un ciclo de amplificación, por ejemplo pero sin limitación, los procedimientos secuenciales de: Interacción de una polimerasa con un promotor; síntesis de una hebra de nucleótidos de manera dependiente de molde usando una polimerasa y desnaturalización del dúplex de ácido nucleico recién formado para separar las hebras.

- 55

En otra realización, una o ambas sondas de ligamiento comprenden una secuencia cebadora. Como se esboza a continuación, los productos de ligamiento de la presente invención pueden usarse en reacciones adicionales tales como reacciones de amplificación enzimática. En una realización, las sondas de ligamiento incluyen secuencias cebadoras diseñadas para permitir un nivel de amplificación adicional. Como se usa en la presente memoria, el término "cebador" hace referencia a una secuencia nucleotídica, tanto de origen natural como en una digestión purificada por restricción o producida sintéticamente, que puede actuar como punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico cuando se dispone en condiciones en que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario de una hebra de ácido nucleico, concretamente en presencia de diferentes trifosfatos nucleotídicos y una polimerasa en un tampón apropiado ("tampón" incluye pH, fuerza iónica, cofactores, etc.) y a una temperatura adecuada. Uno o más de los nucleótidos del cebador pueden estar modificados, por ejemplo, mediante la adición de un grupo metilo, un resto de biotina o digoxigenina, un marcaje fluorescente o usando nucleótidos radiactivos. Una secuencia cebadora no tiene que reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, puede enlazarse un fragmento nucleotídico no complementario con el extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia cebadora sustancialmente complementaria de la hebra diana.

Usando varias secuencias cebadoras y cebadores, un primer producto de ligamiento puede servir como molde para productos de ligamiento adicionales. Estas secuencias cebadoras pueden servir como sitios de cebado para reacciones de PCR, que pueden usarse para amplificar los productos de ligamiento. Además de las reacciones de PCR, otros métodos de amplificación pueden utilizar las secuencias cebadoras, incluyendo pero sin limitación las reacciones en cadena de ligasa, Invader™, amplificación posicional por traslación de mella (NICK), extensión por cebador/traslación de mella y otros métodos conocidos en la materia. Como se usa en la presente memoria, "amplificación" hace referencia a un aumento del número de copias de un ácido nucleico particular. Las copias de un ácido nucleico particular preparadas *in vitro* en una reacción de amplificación se denominan "amplicones" o "productos de amplificación".

La amplificación puede ocurrir también mediante una segunda reacción de ligamiento, en que los sitios cebadores sirven como sitios de hibridación para un nuevo conjunto de sondas de ligamiento que pueden comprender o no secuencias que son idénticas al primer conjunto de sondas de ligamiento que produjeron los productos de ligamiento originales. La secuencia diana se amplifica por tanto exponencialmente mediante la amplificación de los productos de ligamiento en ciclos posteriores de amplificación.

En otra realización de este aspecto de la invención, se usan las secuencias cebadoras para reacciones de ligamiento anidadas. En dichas reacciones de ligamiento anidadas, se logra una primera reacción de ligamiento usando métodos descritos en la presente memoria de tal modo que el producto de ligamiento pueda capturarse usando, por ejemplo, cebadores biotinilados en la hebra deseada y captura en perlas (particularmente perlas magnéticas) recubiertas con estreptavidina. Después de capturar los productos de ligamiento, se logra una segunda reacción de ligamiento mediante la hibridación de sondas de ligamiento con las secuencias cebadoras en una sección del producto de ligamiento que se retira espacialmente (concretamente en dirección 3') del extremo del producto de ligamiento que está enlazado con la perla de captura, sonda, etc. Al menos una de las secuencias cebadoras para la reacción de ligamiento secundaria estará localizada en la región del producto de ligamiento complementaria de la sonda de ligamiento que no es la sonda de ligamiento que incluía la secuencia de anclaje o captura. Los productos de ligamiento de esta segunda reacción de ligamiento serán por tanto necesariamente el resultado solo de aquellas secuencias formadas exitosamente a partir del primer ligamiento químico, retirando por tanto cualquier "falso positivo" de la reacción de amplificación. En otra realización, las secuencias cebadoras usadas en la reacción secundaria pueden ser sitios cebadores de otros tipos de reacciones de amplificación, tales como PCR.

En una realización, una o más sondas de ligamiento comprenden una secuencia de anclaje. Se entiende en la presente memoria por "secuencia de anclaje" un componente de una sonda de ligamiento que permite el enlazamiento de un producto de ligamiento con un soporte con fines de detección. Los medios adecuados para detección incluyen un soporte que tiene enlazado con el mismo un resto de captura apropiado. Generalmente, dicho enlazamiento ocurrirá mediante hibridación de la secuencia de anclaje con una sonda de captura que es sustancialmente complementaria de la secuencia de anclaje.

En una realización de este aspecto de la invención, el oligonucleótido en dirección 5' está diseñado para tener un segmento nucleotídico adicional que no se une a la diana de interés, si no que ha de usarse para capturar posteriormente el producto ligado sobre un soporte sólido adecuado o dispositivo de algún tipo. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el oligonucleótido en dirección 3' tiene un marcador detectable enlazado con el mismo, de tal modo que, después del ligamiento, el producto resultante contendrá una secuencia de captura para soporte sólido en su extremo 3' y un marcador detectable en su extremo 5', y solo los productos ligados contendrán tanto la secuencia de captura como el marcador.

En otro aspecto de la invención relacionado con la detección de dianas múltiples, cada sonda en dirección 5' de un conjunto de sondas puede diseñarse para tener una única secuencia en su extremo 3' que corresponde a una posición diferente en una matriz de ADN. Cada sonda en dirección 3' de un conjunto de sondas puede contener opcionalmente un marcador detectable que es idéntico a las demás sondas en dirección 3', pero con una secuencia de unión a diana única que corresponde a sus dianas respectivas. Después de hibridar con la matriz de ADN, solo

serán observables las sondas ligadas que tienen tanto una secuencia directora (sonda en dirección 5') como un marcador (sonda en dirección 3').

En otro aspecto de la invención, el marcador detectable puede enlazarse con la sonda en dirección 5' y la secuencia de captura puede ser una parte de la sonda en dirección 3', de tal modo que los productos ligados tendrán el marcador detectable más hacia el extremo 3' y la secuencia de captura hacia el extremo 5' del producto ligado. La configuración exacta se determina mejor mediante la consideración de la facilidad de síntesis así como las características de los dispositivos para usar para detectar posteriormente el producto de reacción ligado.

La secuencia de anclaje puede tener porciones tanto de ácido nucleico como no de ácido nucleico. Por tanto, por ejemplo, pueden usarse ligadores flexibles tales como grupos alquilo, incluyendo ligadores de polietilenglicol, para proporcionar un espacio entre la porción de ácido nucleico de la secuencia de anclaje y la superficie de soporte. Esto puede ser particularmente útil cuando los productos de ligamiento son grandes.

Además, en algunos casos pueden usarse conjuntos de secuencias de anclaje que corresponden a las sondas de captura de "matrices universales". Como es conocido en la materia, las matrices pueden prepararse con secuencias genéricas sintéticas como sondas de captura, que se diseñan para no ser complementarias de las secuencias diana de la muestra que se está analizando, sino complementarias de las secuencias de unión a la matriz del conjunto de sondas de ligamiento. Estas "matrices universales" pueden usarse para múltiples tipos de muestras y ensayos de diagnóstico debido a que algunas secuencias de unión a matriz de las sondas pueden reutilizarse/acoplarse con diferentes secuencias de reconocimiento diana.

En una realización, una o más sondas de ligamiento comprenden un marcador. Se entiende en la presente memoria por "marcador" o "marcado" que un compuesto tenga al menos un elemento, isótopo o compuesto químico enlazado para posibilitar la detección del compuesto, por ejemplo, vuelve una sonda de ligamiento o producto de ligamiento o transferencia detectable usando métodos de detección conocidos, por ejemplo, métodos electrónicos, espectroscópicos, fotoquímicos o electroquimioluminiscentes. En general, los marcadores entran dentro de tres clases: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) magnéticos, eléctricos, térmicos; y c) tintes coloreados o luminiscentes; aunque los marcadores incluyen enzimas y partículas tales como partículas magnéticas también. Los tintes pueden ser cromóforos o fósforos, pero son preferiblemente tintes fluorescentes que, debido a su fuertes señales, proporcionan una buena relación de señal a ruido. Los tintes adecuados para uso en la invención incluyen, pero sin limitación, complejos de lantánidos fluorescentes, incluyendo aquellos de europio y terbio, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, carboxifluoresceína (FAM), diclorotriazinilaminofluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, umbeliferona, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde de malaquita, Cy3, Cy5, estilbeno, amarillo Lucifer, azul Cascade.TM., rojo de Texas, tintes de alexa, cloruro de dansilo, ficoeritrina, proteína fluorescente verde y sus variantes de longitud de onda desplazada, bodipy y otros conocidos en la materia tales como aquellos descritos en Haugland, "Molecular Probes Handbook", (Eugene, Oreg.) 6ª edición; "The Synthege catalog" (Houston, Tex.), Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 2ª ed., Plenum Press Nueva York (1999), y otros descritos en la 6ª edición de "Molecular Probes Handbook" de Richard P. Haugland, incorporados expresamente a la presente memoria como referencia. Los marcadores adicionales incluyen nanocristales o Q-dot como se describen en el documento U.S. nº de serie. 09/315.584, incorporado expresamente a la presente memoria como referencia.

En una realización preferida, el marcador es un marcador secundario que forma parte de un par de copartícipes de unión. Por ejemplo, el marcador puede ser un hapteno o antígeno que se unirá a su copartícipe de unión. En una realización preferida, el copartícipe de unión puede enlazarse con un soporte sólido, permitiendo la separación de los cebadores extendidos y no extendidos. Por ejemplo, los pares copartícipes de unión adecuados incluyen, pero sin limitación: antígenos (tales como proteínas (incluyendo péptidos)) y anticuerpos (incluyendo fragmentos de los mismos (FAb, etc.)); proteínas y moléculas pequeñas, incluyendo biotina/estreptavidina; enzimas y sustratos o inhibidores; otros pares de interacción proteína-proteína; receptor-ligandos y carbohidratos y sus copartícipes de unión. Son también útiles pares de ácido nucleico-proteína de unión a ácido nucleico. En general, se enlaza al NTP el menor del par para incorporación al cebador. Los pares copartícipes de unión preferidos incluyen, pero sin limitación, biotina (o iminobiotina) y estreptavidina, digoxigenina y reactivos Abs y Prolinx.TM.

En una realización preferida, el par copartícipe de unión comprende biotina o iminobiotina y estreptavidina. La iminobiotina se prefiere particularmente, ya que la iminobiotina se disocia de la estreptavidina en tampón a pH 4,0, mientras que la biotina requiere desnaturizantes fuertes (por ejemplo, HCl de guanidinio 6 M, pH 1,5 o formamida al 90 % a 95 °C).

En una realización preferida, el par copartícipe de unión comprende un marcador de detección primario (por ejemplo, enlazado con una sonda de ligamiento) y un anticuerpo que se unirá específicamente al marcador de detección primario. Se entiende en la presente memoria por "unirse específicamente" que los copartícipes se unan con especificidad suficiente para diferenciar entre el par y otros componentes o contaminantes del sistema. La unión debería ser suficiente para permanecer unido en las condiciones del ensayo, incluyendo etapas de lavado para eliminar la unión no específica. En algunas realizaciones, las constantes de disociación del par serán menores de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-6} M⁻¹, prefiriéndose menos de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-9} M⁻¹ y prefiriéndose particularmente 10^{-9} M⁻¹.

En una realización preferida, el marcador secundario es un resto modificado químicamente. En esta realización, los marcadores que comprenden grupos funcionales reactivos se incorporan al ácido nucleico. El grupo funcional puede marcarse posteriormente entonces con un marcador primario. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos amino, grupos carboxilo, grupos maleimida, grupos oxo y grupos tiol, prefiriéndose particularmente los grupos amino y grupos tiol. Por ejemplo, los marcadores primarios que contienen grupos amino pueden enlazarse con marcadores secundarios que comprenden grupos amino, por ejemplo usando ligadores como son conocidos en la materia; por ejemplo, ligadores homobifuncionales o heterobifuncionales como son bien conocidos (véase "Catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company", sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200, incorporado a la presente memoria como referencia).

En esta realización, el marcador puede ser también una secuencia de unión a sonda de marcaje o complemento de la misma. Se entiende en la presente memoria por "sonda de marcaje" un ácido nucleico que es sustancialmente complementario de la secuencia de unión y está marcado, generalmente de forma directa.

Métodos sintéticos

Las composiciones de la invención se preparan generalmente usando técnicas sintéticas conocidas. En general, las metodologías basadas en las químicas de fosforamidita estándar encuentran uso particular en un aspecto de la presente invención aunque, como se aprecia por los especialistas en la materia, son conocidas una amplia variedad de reacciones sintéticas de ácido nucleico.

Los métodos de preparación de sondas que tienen grupos salientes de halógeno son conocidos en la materia; véanse, por ejemplo, Abe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(2): 263-8; Silverman *et al.*, Nucleic Acids Res. (2005) 33(15): 4978-86; Cuppolletti *et al.*, Bioconjug. Chem. (2005) 16(3): 528-34; Sando *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (2004) 4: 126(4): 1081-7; Sando *et al.*, Nucleic Acids Res. Suppl. (2002): 121-2; Sando *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (2002) 124(10): 2096-7; Xu *et al.*, Nat. Biotechnol. (2001) 19(2): 148-52; Xu *et al.*, Nucleic Acids Res. (1998) 26(13): 3159-64; Moran *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94(20): 10506-11; Kool, patente de EE.UU. nº 7.033.753; Kool, patente de EE.UU. nº 6.670.193; Kool, patente de EE.UU. nº 6.479.650; Kool, patente de EE.UU. nº 6.218.108; Kool, patente de EE.UU. nº 6.140.480; Kool, patente de EE.UU. nº 6.077.668; Kool, patente de EE.UU. nº 5.808.036; Kool, patente de EE.UU. nº 5.714.320; Kool, patente de EE.UU. nº 5.683.874; Kool, patente de EE.UU. nº 5.674.683; y Kool, patente de EE.UU. nº 5.514.546.

Se incorporan generalmente componentes adicionales tales como marcadores, secuencias cebadoras, secuencias promotoras, etc. como es conocido en la materia. El espaciado de la adición de fluoróforos e inactivadores es bien conocido también.

Reacciones secundarias

Antes de detectar el producto de la reacción de ligamiento o transferencia, puede haber reacciones de amplificación adicionales. Las reacciones de amplificación secundarias pueden usarse para aumentar la señal para detección de la secuencia diana, por ejemplo, aumentando el número de productos ligados producidos por copia de diana. En una realización, puede efectuarse cualquier número de reacciones de amplificación estándares en el producto de ligamiento incluyendo, pero sin limitación, amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación por ligamiento y reacción en cadena de la polimerasa (PCR); incluyendo una serie de variaciones de PCR, incluyendo "PCR competitiva cuantitativa" o "PCR-CC", "PCR cebada arbitrariamente" o "PCR-CA", "inmunoPCR", "PCR-Alu", "PCR de polimorfismo conformacional monocatenario" o "PCR-PCMC", "PCR por transcriptasa inversa" o "PCR-TI", "PCR con captura de biotina", "PCR Vectorette", "PCR de mango de sartén" y "sustracción de ADNc por PCR Select", entre otras. En una realización, la técnica de amplificación no es PCR. Según ciertas realizaciones, pueden usarse técnicas de ligamiento tales como ligamiento con relleno de hueco incluyendo, sin limitación, OLA y LCR con relleno de hueco, ligamiento con oligonucleótidos de puente, FEN-LCR y ligamiento de corrección. Las descripciones de estas técnicas pueden encontrarse, entre otros sitios, en la patente de EE.UU. nº 5.185.243, solicitud de patente europea publicada EP 320308 y EP 439182, solicitud de patente PCT publicada WO 90/01069 y solicitud de patente PCT publicada WO 02/02823.

Además de reacciones de amplificación enzimática estándares, es posible diseñar esquemas de sonda en que el producto ligado que se produce inicialmente pueda ser por sí mismo la diana de una reacción de ligamiento químico secundario.

Además, pueden realizarse "reacciones de preamplificación" sobre ácidos nucleicos de muestra de partida para generar más secuencias diana para la reacción de ligamiento químico. Por ejemplo, puede realizarse la amplificación del genoma entero.

Ensayos

Como se apreciará por los especialistas en la materia, los ensayos que utilizan métodos y composiciones de la invención pueden tomar una amplia variedad de configuraciones, dependiendo de la aplicación deseada, y pueden incluir ensayos *in situ* (similares a FISH), ensayos basados en disolución (por ejemplo, transferencia/retirada de

fluoróforos y/o inactivadores) y ensayos heterogéneos (por ejemplo, utilizando soportes sólidos para manipulación, retirada y/o detección, tales como el uso de matrices de alta densidad). Además, los ensayos pueden incluir reacciones adicionales tales como la preamplificación de secuencias diana y reacciones de amplificación secundaria después de ocurrir el ligamiento, como se esboza en la presente memoria.

- 5 Los ensayos referentes a este aspecto de la invención, como se describen en la presente memoria, pueden basarse en aumentos de señal, por ejemplo, la generación de fluorescencia o quimioluminiscencia. Sin embargo, como se apreciará por los especialistas en la materia, son también posibles ensayos que se basan en reducciones de dichas señales.

- 10 En una realización, se efectúan las reacciones de ensayo "*in situ*" (también se hace referencia a diversos formatos de ensayo como "*in vitro*" y/o "*ex vivo*" dependiendo de la muestra), de forma similar a las reacciones FISH. Puesto que no tienen que añadirse enzimas exógenas, pueden añadirse los reactivos a células (vivas, electroporadas, fijadas, etc.) tales como muestras histológicas para la determinación de la presencia de secuencias diana, particularmente aquellas asociadas a estados patológicos u otras patologías.

- 15 Además, pueden realizarse ensayos "*in vitro*" en que se extraen secuencias diana de muestras. Las muestras pueden procesarse (por ejemplo, para muestras embebidas en parafina, la muestra puede prepararse), añadirse los reactivos y dejar evolucionar la reacción, siguiendo la detección como se realiza en la materia.

- 20 En una realización, se detectan los productos ligados usando soportes sólidos. Por ejemplo, los productos ligados se enlazan con perlas usando hibridación de sonda de anclaje/sonda de captura u otras técnicas de unión, tal como el uso de un par de copartícipes de unión (por ejemplo, biotina y estreptavidina). En una realización, una reacción de transferencia da como resultado que un resto de biotina se transfiera desde la primera sonda de ligamiento a la segunda sonda de ligamiento que comprende un marcador. Se ponen en contacto perlas que comprenden estreptavidina con la muestra y se examina en las perlas la presencia del marcador, usando por ejemplo tecnologías de FACS.

- 25 En otras realizaciones, se detectan los productos ligados usando ensayos heterogéneos. Es decir, la reacción se realiza en disolución y el producto se añade a un soporte sólido, tal como una matriz o perlas. Generalmente, una sonda de ligamiento comprende una secuencia de anclaje o un copartícipe de par de unión (por ejemplo, biotina, haptenos, etc.) y la otra comprende un marcador (por ejemplo, un fluoróforo, una secuencia de unión a sonda marcada, etc.). Se añade el producto ligado al soporte sólido y se lava opcionalmente el soporte. En esta realización, solo se capturará y marcará el producto ligado.

- 30 En otro aspecto de la invención, una de las sondas oligonucleotídicas tiene una perla magnética enlazada o algún otro marcador (biotina) que permita una fácil manipulación del producto ligado. La perla magnética o marcador puede enlazarse con la sonda en dirección 5' o 3' usando cualquier número de configuraciones como se esboza en la presente memoria.

- 35 Como se describe en la presente memoria, pueden realizarse también reacciones secundarias en que se añaden restos funcionales adicionales (por ejemplo, secuencias de anclaje, cebadores, marcadores, etc.). De forma similar, pueden realizarse reacciones de amplificación secundaria como se describe en la presente memoria.

- 40 Son conocidos en la materia sistemas de detección, e incluyen ensayos ópticos (incluyendo ensayos de fluorescencia y quimioluminiscencia), ensayos enzimáticos, radiomarcaje, resonancia de plasmón de superficie, magnetorresistencia, flecha del voladizo, resonancia de plasmón de superficie, etc. En algunas realizaciones, el producto ligado puede usarse en tecnologías de ensayo adicionales, por ejemplo como se describe en el documento WO 2006/0068378, el producto ligado puede servir como ligador entre partículas difusoras de luz tales como coloides, dando como resultado un cambio de color en presencia del producto ligado.

- 45 En algunas realizaciones, el sistema de detección puede incluirse en el tubo de recogida de muestra; por ejemplo, los dispositivos de recogida de sangre pueden tener ensayos incorporados a los tubos o dispositivos para permitir la detección de patógenos o enfermedades.

Soportes sólidos

Como se esboza anteriormente, los ensayos pueden ejecutarse de una variedad de formas. En ensayos que utilizan la detección sobre soportes sólidos, existe una variedad de soportes sólidos, incluyendo matrices, que encuentran uso en la invención.

- 50 En algunas realizaciones, los soportes sólidos tales como perlas encuentran uso en la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse pares de copartícipes de unión (uno en el producto ligado y otro en la perla) como se esboza anteriormente para retirar los reactantes no ligados. En esta realización, se prefieren particularmente perlas magnéticas.

- 55 En algunas realizaciones de la invención, se enlazan sondas de captura con soportes sólidos para detección. Por ejemplo, las sondas de captura pueden enlazarse con perlas para análisis posterior usando cualquier técnica

adecuada, por ejemplo, FACS. De forma similar, pueden usarse matrices de perlas como se describe a continuación.

En una realización, la presente invención proporciona matrices, comprendiendo cada localización de matriz como mínimo una sonda de ácido nucleico enlazada covalentemente, a la que se hace referencia generalmente como "sonda de captura". Se entiende en la presente memoria por "matriz" una pluralidad de sondas de ácido nucleico en formato de matriz; el tamaño de la matriz dependerá de la composición y uso final de la matriz. Pueden realizarse matrices que contienen de aproximadamente 2 ligandos de captura diferentes a muchos miles. Generalmente, para ensayos basados en electrodos, la matriz comprenderá de 2 a tantos como 100.000 o más, dependiendo del tamaño de los electrodos, así como del uso final de la matriz. Los intervalos preferidos son de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000, prefiriéndose de aproximadamente 5 a aproximadamente 1.000, y prefiriéndose particularmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden no estar en formato de matriz, es decir, para algunas realizaciones pueden realizarse composiciones que comprenden una sola sonda de captura también. Además, en algunas matrices, pueden usarse múltiples sustratos, de composiciones diferentes o idénticas. Por tanto, por ejemplo, las matrices grandes pueden comprender una pluralidad de sustratos más pequeños. Las matrices de ácido nucleico son conocidas en la materia, y pueden clasificarse de una serie de formas; se incluyen tanto matrices ordenadas (por ejemplo, con la capacidad de resolver químicas en sitios discretos) como matrices aleatorias (por ejemplo, matrices de perlas). Las matrices ordenadas incluyen, pero sin limitación, aquellas preparadas usando técnicas de fotolitografía (por ejemplo, Affymetrix GeneChip®), técnicas de localización (Synteni y otros), técnicas de impresión (Hewlett Packard y Rosetta), matrices de electrodos, matrices de "almohadilla de gel" tridimensionales y matrices líquidas.

En una realización preferida, las matrices se presentan sobre un sustrato. Se entiende por "sustrato" o "soporte sólido" u otro equivalente gramatical en la presente memoria cualquier material que pueda modificarse para contener sitios individuales discretos apropiados para enlazar o asociar ácidos nucleicos. El sustrato puede comprender una amplia variedad de materiales, como se apreciará por los especialistas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, vidrio, plástico, polímeros, metales, metaloides, cerámica y compuestos orgánicos. Cuando el soporte sólido es una perla, son posibles una amplia variedad de sustratos incluyendo, pero sin limitación, materiales magnéticos, vidrio, silicio, dextranos y plásticos.

Equipo físico

Microfluidos

En otro aspecto de la invención, se usa un dispositivo de fluidos similar a los descritos por Liu (2006) para automatizar la metodología descrita en esta invención. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.942.771 para componentes incluyendo, pero sin limitación, cartuchos, dispositivos, bombas, pocillos, cámaras de reacción y cámaras de detección. El dispositivo de fluidos puede incluir también zonas para la captura de partículas magnéticas, filtros y resinas de separación, incluyendo membranas para separación celular (concretamente, Leukotrap™ de Pall). El dispositivo puede incluir cámaras de detección para imagenología en cartucho de la señal de fluorescencia generada durante amplificación por PCR instantánea (concretamente, SYBR green, Taqman, Molecular Beacons), así como canales de electroforesis capilar para la separación y detección de productos de reacción en el dispositivo (amplicones y productos de ligamiento). En una realización preferida, el canal de electroforesis capilar puede moldearse en un sustrato de plástico y rellenarse con una matriz polimérica de tamizado (POP-7™ de Applied Biosystems). Pueden usarse también canales que contienen matriz no de tamizado con conjuntos de sonda diseñados apropiadamente.

En una realización preferida, el dispositivo comprende componentes de manejo de líquidos, incluyendo componentes para cargar y descargar fluidos en cada puesto o conjunto de puestos. Los sistemas de manejo de líquidos pueden incluir sistemas robóticos que comprenden cualquier número de componentes. Además, pueden automatizarse cualquiera o todas las etapas esbozadas en la presente memoria. Por tanto, por ejemplo, los sistemas pueden automatizarse total o parcialmente.

Como se apreciará por los especialistas en la materia, existe una amplia variedad de componentes que pueden usarse incluyendo, pero sin limitación, uno o más brazos robóticos; manipuladores de placas para la colocación de microplacas; monturas con cartuchos y/o tapones; manipuladores automatizados de tapas o tapones para retirar y reemplazar las tapas de pocillos de placas sin contaminación cruzada; montajes de puntas para la distribución de muestra con puntas desechables; montajes de puntas lavables para la distribución de muestras; bloques de carga de 96 pocillos; armazones para reactivos enfriados; posiciones de pipeta de placa de microvaloración (opcionalmente enfriadas); torres de apilamiento para placas y puntas y sistemas informáticos.

Los sistemas totalmente robotizados o microfluídicos incluyen el manejo automatizado de líquidos, partículas, células y organismos, incluyendo pipeteado de alto rendimiento, para efectuar todas las etapas de aplicaciones de cribado. Esto incluye manipulaciones de líquidos, partícula, células y organismos tales como aspiración, dispensación, mezclado, dilución, lavado y transferencias volumétricas exactas; recuperación y desecho de puntas de pipeta y pipeteado repetido de volúmenes idénticos para suministros múltiples a partir de una sola aspiración de muestra. Estas manipulaciones son transferencias de líquidos, partículas, células y organismos exentas de

contaminación cruzada. Este instrumento efectúa una replicación automatizada de muestras de microplacas a filtros, membranas y/o placas derivadas, transferencias de alta densidad, diluciones en serie de placa completa y operaciones de alta capacidad.

5 En una realización preferida, se usan partículas, placas, cartuchos, tubos, partículas magnéticas u otras matrices en fase sólida derivatizadas químicamente con especificidad por los componentes de ensayo. Son útiles en esta invención las superficies de unión de microplacas, tubos o cualquier matriz en fase sólida incluyendo superficies no polares, superficies altamente polares, recubrimiento de dextrano modificado para promover la unión covalente, recubrimiento de anticuerpo, medios de afinidad para unir proteínas o péptidos de fusión, proteínas fijadas a superficie tales como proteína A o G recombinante, resinas o recubrimientos nucleotídicos y otras matrices de afinidad.

10 En una realización preferida, se acomodan plataformas para placas multipocillos, multitubos, monturas, cartuchos, minitubos, placas de pocillos profundos, tubos de microcentrífuga, crioviales, placas de pocillos cuadrados, filtros, chips, fibras ópticas, perlas y cualquier otra matriz o plataforma en fase sólida con diversos volúmenes en una plataforma modular actualizable para capacidad adicional. Esta plataforma modular incluye un agitador orbital de velocidad variable y pletinas de trabajo multiposición para muestras originales, dilución de muestra y reactivo, placas de ensayo, depósitos de muestra y reactivo, puntas de pipeta y un puesto de lavado activo.

15 En una realización preferida, se usan sistemas termocicladores y termorreguladores para estabilizar la temperatura de los intercambiadores de calor tales como bloques o plataformas controlados para proporcionar un control de temperatura exacto de la incubación de muestras desde 0 °C a 100 °C; esto además o en lugar de termocontroladores de puesto.

20 En una realización preferida, se manipulan robóticamente los líquidos, partículas, células y organismos con cabezales de pipeta intercambiables (mono- o multicanal) con una o múltiples sondas magnéticas, sondas de afinidad o pipeteadores. Los separadores magnéticos o plataformas multipocillo o multitubo manipulan líquidos, partículas, células y organismos en formato de muestra simple o múltiple.

25 En algunas realizaciones, la instrumentación incluirá un detector, que puede ser una amplia variedad de diferentes detectores, dependiendo de los marcadores y del ensayo. En una realización preferida, los detectores útiles incluyen un microscopio o microscopios con múltiples canales de fluorescencia; lectores de placa para proporcionar analizadores de impedancia fluorescentes, electroquímicos y/o eléctricos, detección espectrofotométrica de ultravioleta y visible con criterio de valoración de longitud de onda simple y dual y capacidad cinética, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), luminiscencia, inactivación, excitación de dos fotones y redistribución de la intensidad; cámaras de CCD para capturar y transformar datos e imágenes en formatos cuantificables; sistemas de electroforesis capilar, espectrómetros de masas y un puesto de trabajo informatizado.

30 Estos instrumentos pueden caber en una campana de flujo laminar estéril o de humos, o son sistemas autocontenidos cerrados para crecimiento y transformación de cultivo celular en placas multipocillo o tubos y para operaciones peligrosas. Las células vivas pueden crecer en condiciones de crecimiento controladas, con controles de temperatura, humedad y gas para series temporales de ensayos de células vivas. La transformación automatizada de células y los recogedores automatizados de colonias pueden facilitar un cribado rápido de las células deseadas.

35 Pueden usarse los formatos de citometría de flujo o electroforesis capilar para la captura individual de perlas magnéticas y otras, partículas, células y organismos.

40 El equipo físico y programas flexibles permiten la adaptabilidad de los instrumentos para múltiples aplicaciones. Los módulos del programa informático permiten la creación, modificación y operación de métodos. Los módulos de diagnóstico de sistema permiten el alineamiento de instrumentos, las conexiones correctas y las operaciones motoras. Las herramientas, material de laboratorio y patrones de transferencia de líquidos, partículas, células y organismos personalizados permiten efectuar diferentes aplicaciones. La base de datos permite el almacenamiento de métodos y parámetros. Las interfaces robóticas e informáticas permiten la comunicación entre instrumentos.

45 En una realización preferida, el aparato robótico incluye una unidad de procesamiento central que comunica con una memoria y con un conjunto de dispositivos de entrada/salida (por ejemplo, teclado, ratón, monitor, impresora, etc.) a través de un bus. De nuevo, como se esboza a continuación, esto puede ser además de o en lugar de la CPU para los múltiples dispositivos de la invención. La interacción general entre una unidad de procesamiento central, una memoria, dispositivos de entrada/salida y un bus es conocida en la materia. Por tanto, se almacenan en la memoria de la CPU una variedad de diferentes procedimientos, dependiendo de los experimentos para operar.

50 Estos sistemas de manejo robótico de fluidos pueden utilizar cualquier número de diferentes reactivos, incluyendo tampones, reactivos, muestras, lavados, componentes de ensayo tales como sondas de marcaje, etc.

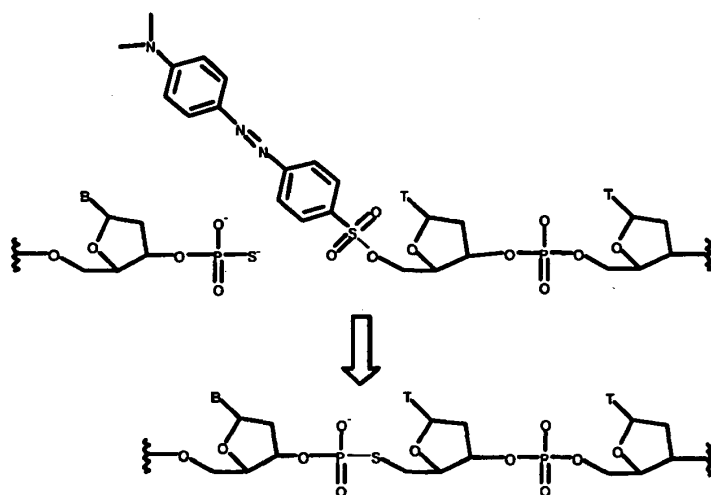
Kits

En otro aspecto de la divulgación, se produce un kit para la detección rutinaria de un conjunto predeterminado de ácidos nucleicos diana que utiliza sondas, técnicas, métodos y una reacción de ligamiento químico como se describen en la presente memoria como parte del proceso de detección. El kit puede comprender sondas, secuencias diana, instrucciones, tampones y/u otros componentes de ensayo.

Amplificación de sondas dependiente de ligamiento químico (CLPA)

La presente invención se refiere a la tecnología de amplificación de sondas dependiente de ligamiento químico (CLPA). La CLPA está basada en el ligamiento químico de sondas oligonucleotídicas específicas de diana formando un producto de ligamiento. Este producto de ligamiento sirve posteriormente como molde para una reacción de amplificación enzimática para producir amplicones, que se analizan posteriormente usando cualquier medio adecuado. La CLPA puede usarse para una variedad de fines incluyendo, pero sin limitación, el análisis de patrones de firma génica complejos. Al contrario que otras técnicas tales como DASL (Bibikova, M., *et al.*, *American Journal of Pathology*, (2004), 165: 5, 1799-1807) y MLPA (Schouten, patente de EE.UU. 6.955.901), que utilizan una reacción de ligamiento enzimático y discuten meramente la disponibilidad del ligamiento químico, la CLPA usa una reacción de ligamiento químico.

En una realización, el ensayo de CLPA comprende el uso de pares de sonda oligonucleotídica que incorporan restos reactivos que pueden autoligarse cuando se colocan apropiadamente en una secuencia diana. En una realización preferida, un resto 3'-fosforotioato en una sonda reacciona con un grupo saliente 5'-dabsilo en la otra sonda (véanse el Esquema 1 y la Figura 6).



Esquema 1: Reacción de ligamiento químico entre un oligonucleótido de 3'-fosforotioato (sonda S) y un oligonucleótido modificado con 5'-dabsilo (sonda L)

El grupo 5'-dabsilo reacciona aproximadamente 4 veces más rápido que otros restos, por ejemplo yodo, y simplifica también la purificación de las sondas durante la síntesis.

La CLPA tiene varias ventajas claras frente a otras técnicas de hibridación basadas en secuencia. En primer lugar, la CLPA puede aplicarse directamente al análisis de ARN sin necesidad de preparar una copia de ADN previamente. En segundo lugar, la CLPA es relativamente insensible a los contaminantes de muestra y puede aplicarse directamente a muestras impuras, incluyendo muestras corporales tales como sangre, orina, saliva y heces. En tercer lugar, la CLPA implica menos etapas que otros métodos conocidos, reduciendo así el tiempo necesario para obtener un resultado. Además, las sondas de CLPA pueden almacenarse secas y los sistemas apropiadamente diseñados reaccionarán espontáneamente uniendo dos o más oligonucleótidos en presencia de una secuencia diana complementaria. Las reacciones de ligamiento químico muestran una excelente selectividad de secuencia y pueden usarse para discriminar polimorfismos mononucleotídicos.

De forma significativa, al contrario que los métodos de ligamiento enzimático, la CLPA muestra una reactividad casi idéntica en dianas de ADN y ARN lo que, como se describe más completamente a continuación, vuelve la CLPA más eficaz que otros sistemas conocidos y amplía el alcance de las aplicaciones en que pueden utilizarse CLPA.

Ventajosamente, el ensayo de CLPA reduce el número de etapas requeridas para conseguir un resultado, lo que proporciona el potencial de conseguir resultados en periodos de tiempo significativamente más cortos. Por ejemplo, el flujo de proceso general para un ligamiento de sonda dependiente de ligasa múltiple (MLPA) con transcriptasa inversa (TI) estándar implica las siguientes etapas:

1. Aislar el ARN total.
2. Usar transcriptasa inversa para preparar la copia de ADNc.
3. Hibridar los conjuntos de sondas de MLPA con la diana de ADNc durante una noche.
4. Añadir ADN ligasa para unir las sondas unidas a diana.
5. Amplificar las sondas ligadas, por ejemplo amplificación por PCR usando polimerasa Taq y cebadores de PCR marcados fluorescentemente.
6. Analizar la muestra, por ejemplo por CE.

Al contrario que la MLPA-TI estándar, la CLPA posibilita llevar a cabo el análisis directamente en las células y lisados celulares y en dianas de ARN. Por tanto, al contrario que una MLPA-TI, la CLPA evita la necesidad de tener o aislar el ARN y efectuar entonces la transcripción inversa para preparar una copia de ADNc antes del ligamiento. Esto acorta el tiempo para conseguir un resultado y proporciona un medio para conseguir análisis más rápidos.

Es una ventaja adicional de la CLPA que la incorporación de un resto de captura a una sonda posibilita un método rápido y específico de purificación del producto de ligamiento resultante a partir de la muestra bruta, exento de todas las impurezas y materiales de ácido nucleico no diana, como se describe a continuación para una sonda marcada con biotina. Esta capacidad es particularmente ventajosa en aplicaciones en que el ácido nucleico diana se encuentra en presencia de un gran exceso de ácido nucleico no diana, tal como en la detección de agentes infecciosos (bacterias, hongos, virus). En este caso, la presencia de grandes cantidades de ácido nucleico hospedador requiere el uso de un método de extracción de alta capacidad, que a su vez puede dar como resultado una amplificación ineficaz del ácido nucleico diana debido a las grandes cantidades de ácido nucleico no diana y/o a la acumulación de contaminantes inhibidores.

En otra realización de este aspecto de la invención, se facilitan adicionalmente tiempos de reacción más rápidos al activar la reacción de hibridación con concentraciones de sonda mayores. Por tanto, por ejemplo, pueden incorporarse conjuntos de muestras de entrada a la reacción de CLPA a concentraciones relativamente altas, por ejemplo, aproximadamente 100 veces mayores que aquellas usadas típicamente en una reacción de MLPA. Elevar la concentración de sonda reduce significativamente el tiempo requerido para la etapa de hibridación, típicamente desde una noche a entre aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 1 hora.

Cuando se usan concentraciones de sonda mayores, se prefiere generalmente incorporar una etapa de purificación antes de la amplificación, especialmente para análisis de alta multiplicidad (por ejemplo, de más de 5 dianas). En una realización de este aspecto de la invención, puede emplearse una metodología de captura basada en soporte sólido, incluyendo captura de membrana, captura de perlas magnéticas y/o captura de partículas. En una realización preferida, se emplea un protocolo de purificación de perla magnética de biotina/estreptavidina después del ligamiento y antes de la amplificación enzimática. En algunos casos, las partículas magnéticas pueden añadirse directamente a la mezcla maestra de amplificación sin interferir con la reacción de amplificación posterior. En otros casos, es preferible liberar el oligonucleótido capturado de las perlas y amplificar la disolución de oligonucleótido liberado posteriormente sin que esté presente la partícula o superficie de captura.

En una realización preferida, la CLPA implica la hibridación de un conjunto de sondas con secuencias de ácido nucleico diana de tal modo que las sondas puedan experimentar autoligamiento sin la adición de una ligasa. Después de producir un producto de ligamiento, se prefiere generalmente una amplificación para facilitar la detección y análisis del producto. Con este fin, se diseñan preferiblemente sondas que incorporan cebadores de PCR tales como, por ejemplo, cebadores de PCR universales. En una realización preferida, los cebadores universales no se añaden hasta después de completar la parte de ligamiento de la reacción, y los cebadores se añaden después de la purificación de captura de superficie junto con la polimerasa, a menudo como parte de una mezcla maestra de PCR.

Las sondas de CLPA poseen restos reactivos colocados de tal modo que, cuando las sondas de CLPA se unen a la diana de ácido nucleico, los restos reactivos están en orientación espacial cercana y pueden experimentar una reacción de ligamiento sin la adición de enzima. En una realización preferida, los restos de ligamiento químico se eligen para proporcionar un producto de reacción ligado que pueda amplificarse eficazmente por la enzima de amplificación, que a menudo es una ADN polimerasa. Sin limitarse a teoría alguna, es más probable que las químicas de ligamiento químico y diseños de conjunto de sondas que producen productos de reacción que se asemejan más estrechamente a sustratos que son conocidos por poder amplificarse por ADN y ARN polimerasas proporcionen conjuntos de sondas eficaces que puedan usarse en el ensayo de CLPA. Son químicas de reacción especialmente preferidas los restos químicos que proporcionan productos de reacción que se asemejan estrechamente a ADN nativo, tal como se ilustra en el Esquema 1, que implica una reacción entre un 3'-fosforotioato y un grupo saliente 5'-dabsilo. En otra realización preferida, los conjuntos de sondas comprenden un 3'-difosforotioato (Miller, G.P. *et al*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, (2008) 16: 56-64) y un grupo saliente 5'-dabsilo.

Las sondas de CLPA incorporan también una secuencia de relleno (a la que se hace referencia también como secuencia espaciadora variable) para ajustar la longitud del producto de ligamiento. Como se describe adicionalmente a continuación, la variación de longitud proporciona un medio conveniente para facilitar el análisis del producto o productos de ligamiento. El relleno puede localizarse en cualquier sonda, aunque por conveniencia se incorpora generalmente a la sonda S (sonda de 3'-fosforotioato).

En una realización de este aspecto de la invención, en CLPA-CE, la secuencia de relleno varía en longitud para producir uno o más productos de ligamiento de longitud variable que proporcionan la base de la detección e identificación de secuencias diana específicas basadas en la variación de longitud. En una realización preferida, los productos de ligamiento de longitud variable se analizan por electroforesis capilar (CE). Generalmente, se incluyen secuencias de relleno de tal modo que la longitud de los diferentes productos de ligamiento varíe en el intervalo de al menos 1 par de bases a aproximadamente 10 pares de bases; preferiblemente de 1 par de bases a 4 pares de bases. En una realización preferida, la longitud de los diferentes productos de ligamiento varía de aproximadamente 80 pb a aproximadamente 400 pb; preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 100 pb a aproximadamente 300 pb; más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 100 pb a aproximadamente 200 pb.

En otra realización, las sondas de CLPA pueden contener también otro elemento o elementos opcionales para facilitar el análisis y detección de un producto ligado. Por ejemplo, se prefiere que una de las sondas para uso en una realización de la presente memoria a la que se hace referencia como CLPA-MDM, incorpore una secuencia de unión a matriz para unirse a una secuencia de captura apropiada en una plataforma de micromatriz. Para CLPA-MDM, los diferentes productos de reacción de CLPA no se separan por diferencias de tamaño, sino por las diferencias en la secuencia de unión a matriz. En esta realización, la secuencia de la secuencia de unión a matriz varía de modo que cada sonda de CLPA se una a un único sitio en una micromatriz de ADN. La longitud de la secuencia de unión a matriz en CLPA-MDM varía habitualmente de 15 a 150 bases, más específicamente de 20 a 80 bases y lo más específicamente de 25 a 50 bases. En algunas realizaciones, las sondas de CLPA incluyen preferiblemente también otros elementos para facilitar la purificación y/o análisis incluyendo, pero sin limitación, marcadores tales como marcadores fluorescentes y restos de hapteno tales como, por ejemplo, biotina para purificar o detectar un producto o productos de ligamiento. Por ejemplo, las sondas y/o producto o productos de ligamiento que incorporan biotina pueden purificarse en cualquier plataforma de avidina/estreptavidina adecuada, incluyendo perlas. Aunque se prefieren los sistemas de captura de biotina/avidina, pueden usarse otros sistemas de hapteno (por ejemplo, marcaje con digoxigenina (DIG), así como hibridación/captura de oligonucleótido. La hibridación/captura de oligonucleótido es un método preferido cuando es deseable liberar el producto de captura de las perlas en una etapa posterior. Además de perlas magnéticas, pueden usarse soportes marcados antihapteno (papel de filtro, filtros porosos, captura de superficie).

El marcaje de sonda de CLPA puede ser en cualquier sonda, en el extremo o internamente. Preferiblemente, se incorpora la biotina en el extremo 5' del fosforotioato (sonda S).

Las sondas de CLPA se incorporan generalmente a una reacción a una concentración 250 nanomolar (nM) a 0,01 pM (picomolar) para cada sonda. Generalmente, la concentración está entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 pM. Los factores a considerar cuando se elige la concentración de sonda incluyen el ensayo particular y la diana que se esté analizando. La sonda S o fosforotioato o nucleófila y las sondas que contienen el grupo L o saliente o dabsilo se incorporan a una concentración que iguala o supera la concentración de la diana. La concentración total de sondas S y L puede alcanzar del orden de 10 micromolar (uM). Como ejemplo no limitante, 1 nM para cada sonda S y L x 250 pares de sonda de CLPA daría 500 nM (1 nM por sonda x 2 sondas por par x 250 dianas) a 10 nM para cada sonda significaría una concentración total de 5 uM.

La concentración de diana oscila habitualmente de aproximadamente 10 microgramos de ARN total a aproximadamente 10 nanogramos, pero puede ser tan baja como una sola copia de un gen.

En una realización preferida de la tecnología de CLPA, un conjunto de sondas de CLPA consiste en 2 sondas oligonucleotídicas con grupos reactivos complementarios (Figura 1 y 2). En otra realización, el conjunto de sondas de CLPA puede consistir en 3 o más sondas que se unen adyacentes entre sí en una diana. En una realización preferida de la reacción de CLPA de 3 sondas, las sondas externas se diseñan para contener los sitios de unión a cebador de amplificación, y la sonda interna se diseña para cubrir la región de la diana entre las otras sondas. En una realización más preferida, las sondas externas tienen grupos reactivos no complementarios, de tal modo que no pueden reaccionar entre sí en ausencia de la sonda interna (media) (Figura 3). En algunos casos, ambas sondas externas pueden tener restos reactivos similares, excepto porque un grupo está en el extremo 5' de una sonda y el extremo 3' de la otra sonda, y las químicas de la sonda L pueden ser también similares entre así, excepto por la posición en la sonda. Como es conocido por el especialista en la materia, pueden necesitarse diferentes reactivos químicos y procesos para fabricar las sondas para la reacción de CLPA de 3 sondas, en comparación con las sondas para el sistema de CLPA de 2 sondas.

En una realización preferida del sistema de CLPA de 3 sondas, una sonda externa contiene un 3'-fosforotioato (sonda 3'S), la otra sonda exterior contiene un 5'-fosforotioato (sonda 5'S) y la sonda central contiene un grupo saliente dabsilo tanto 3' como 5'. La fabricación del grupo saliente 5'-dabsilo se ha reseñado anteriormente (Sando

et al., *J. Am. Chem. Soc.*, (2002), 124(10) 2096-2097). Se ha desarrollado recientemente un nuevo reactivo de síntesis de ADN que permite la incorporación rutinaria de un grupo saliente 3'-dabsilo (Figura 4).

CLPA-CE

5 En una realización, se detectan producto o productos de ligamiento de CLPA por electroforesis capilar (CE) de diferenciación por tamaño en una matriz de tamizado o mediante electroforesis en gel plano. Se proporciona una representación esquemática de CLPA-CE en la Figura 1. En este ejemplo, se efectúa el análisis directamente en una muestra de sangre después de lisis celular mediante cualquier medio apropiado, incluyendo químico, mecánico u osmótico, y adición de sondas diseñadas apropiadamente. En una realización preferida, se usa la lisis química de las células. La Figura 6 proporciona una representación esquemática general del diseño de un conjunto de sondas para análisis de CLPA-CE. En este ejemplo, se diseña la sonda S para incluir un cebador de PCR universal para amplificación posterior del producto o productos de ligamiento; una secuencia de relleno que se diseña con una longitud correlacionada con la diana específica y una secuencia de unión a diana. Igualmente, la sonda L incluye una secuencia de unión a diana y un cebador universal. Las sondas se marcan habitualmente con un fluoróforo (FAM, Cy3, Cy5, etc.), sin embargo pueden detectarse también sin marcaje fluorescente. El marcaje se realiza usando un cebador de PCR marcado fluorescentemente.

10 En este ejemplo de sondas de CLPA-CE, la sonda S incluye también un resto de biotina en el extremo 5' para facilitar la purificación y retirada de sonda no ligada. Después de la amplificación del producto o productos ligados, que tiene cada uno una longitud única, se separa la mezcla de reacción por CE u otra técnica de separación por tamaño adecuada. La altura de pico o intensidad de cada producto es un reflejo de la expresión de la secuencia diana, concretamente, del nivel de diana en la muestra. (Figura 1 y Figura 7).

CLPA-MDM

15 En otra realización de este aspecto de la invención, se analizan/detectan los productos de ligamiento de CLPA mediante análisis de micromatrices (CLPA-MDM). Se proporciona una representación esquemática de CLPA-MDM en la Figura 2. La CLPA-MDM difiere de la CLPA-CE en al menos los siguientes aspectos. En primer lugar, los conjuntos de sondas difieren en diseño. Por ejemplo, se exhibe una representación general de un conjunto de sondas de CLPA-MDM en la Figura 2. Como con las sondas de CLPA-CE, los conjuntos de sondas de CLPA-MDM pueden incluir cebadores universales para amplificación del producto o productos de ligamiento. Incluyen también secuencias específicas de diana, así como restos de ligamiento para ligamiento independiente de enzima. Adicionalmente, las sondas de CLPA-MDM pueden incluir también una secuencia de relleno, sin embargo el fin de esta secuencia de relleno es ajustar el tamaño de la CLPA-MDM a la misma longitud en un esfuerzo por estandarizar la eficacia de amplificación enzimática. La normalización del tamaño de amplificación no es un requisito, sino una realización preferida. Una segunda diferencia entre el diseño de los conjuntos de sondas de CLPA-CE y CLPA-MDM es que los últimos incluyen una única secuencia de unión a matriz para uso con una plataforma de micromatrices apropiada.

20 Con respecto al aspecto de CLPA-MDM de la invención, se incorpora un sitio de unión a micromatriz (secuencia ABS) a los diseños de sonda para uso con una plataforma de micromatrices "universal" para detección. De forma similar al sistema de CLPA-CE, las sondas se marcan preferiblemente con un fluoróforo, por ejemplo usando un cebador de PCR marcado fluorescentemente. Como alternativa, puede usarse por ejemplo una técnica de marcaje de ensayo de sándwich para la lectura final. Los ensayos de sándwich implican diseñar las sondas con un sitio de unión a marcador común (genérico) (LBS) en lugar de o además de la secuencia de relleno y usar una sonda secundaria que se unirá a este sitio durante la etapa de hibridación de matriz. Esta metodología es particularmente útil cuando sea deseable marcar las matrices con un sistema quimioluminiscente como un oligonucleótido marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP), o con un sistema de detección electroquímica. Generalmente, se emplean micromatrices planas (por ejemplo, micromatrices punteadas sobre portaobjetos de vidrio o tarjetas de circuito) para la lectura. Sin embargo, pueden usarse también micromatrices de perlas tales como aquellas disponibles en Luminex e Illumina (por ejemplo, xMAP/xtag de Luminex).

Ejemplo 1

Detección cuantitativa múltiple de 5 dianas

25 Las reacciones de CLPA múltiples se efectuaron usando cinco (5) miméticos de diana de ADN (correspondientes a porciones de los genes MOAP1 (SEQ ID NO:5), PCNA (SEQ ID NO:9), DDB2 (SEQ ID NO:12), BBC3 (SEQ ID NO:16) y BAX (SEQ ID NO:19)) combinados en una reacción en presencia de sus sondas de CLPA respectivas (Tabla 1) (sondas S y L a 1 nM cada una). Los miméticos de sonda se agruparon a diferentes concentraciones como se muestra en la Tabla 2. Se incubaron los miméticos de sonda, sondas S y sondas L en tampón de PCR (1X tampón de PCR es MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) durante 1 hora a 50 °C. Se usó una alícuota de 1 ul de cada mezcla de reacción como molde para amplificación por PCR usando la mezcla de PCR Dynamo SYBR green en presencia de cebadores universales (SEQ ID NO 1 y 2, 300 nM). Se ciclaron por PCR las muestras durante 27 ciclos (95 °C 15 min seguido de 27 ciclos de 95 °C (10 s), 60 °C (24 s), 72 °C (10 s)). Después de la amplificación de PCR, se desnaturalizaron las muestras y se inyectaron en un secuenciador de ADN ABI 3130

(instrumento de electroforesis capilar). Se muestra el trazo de CE de ABI para las 3 muestras, así como una representación del pico frente a la concentración de mimético de diana de PCNA en la Figura 7, y se muestra una representación de la respuesta lineal de la señal de PCNA en función de la concentración de entrada en la Figura 8.

Tabla 1. Información de secuencia de sonda y diana.

SEQ ID	Nombre	Detalle de secuencia	Tamaño de amplicón
1	Cebador de PCR de codificación	FAM-GGGTTCCTAAGGGTTGGA	
2	Cebador de PCR inverso	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	
3	MOAP1-L	LTACATCCTTCCTAGTCAATTACACTCTAGATTGGA TCTTGCTGGCAC	47
4	MOAP1-S	5'-Biotina- GGGTTCCTAAGGGTTGGATAGGTAAAT GGCAGTGTAGAACS	41
		Amplicón de MOAP1 ligado	88
5	Mimético de diana de MOAP1	GTGTAATTGACTAGGAAGGATGTAGTTCTACACTG CCATTTACCTA	
6	Mimético de diana de ARN de MOAP1	GUGUAAUUGACUAGGAAGGAUGUAGUUCUACAC UGCCAUUUACCUA	
7	PCNA-L	LTGGTTTGGTGCTTCAAATACTCTCTAGATTGGATC TTGCTGGCAC	45
8	PCNA-S	Biotina- GGGTTCCTAAGGGTTGGATCGAGTCTACAGATCC CCAACTTTCATAGTCTGAACTTTCTCCS	63
		Amplicón de PCNA ligado	108
9	Mimético de diana de PCNA	AGTATTTGAAGCACCAAACCAGGAGAAAGTTTCA GACTATGA	
10	DDB2-L	LTAGCAGACACATCCAGGCTCTAGATTGGATCTTG CTGGCAC	51
11	DDB2-S	Biotina- GGGTTCCTAAGGGTTGGATCGAGTCTACTCCAAC TTTGACCACCATTTCGGCTACS	49
		Amplicón de DDB2 ligado	96
12	Mimético de diana de DDB2	GCCTGGATGTGTCTGCTAGTAGCCGAATGGTGGTC A	
13	Mimético de diana de ARN de DDB2	GCCUGGAUGUGUCUGCUAGUAGCCGAAUGGUGG UCA	
14	BBC3-L	LTCCGAGATTTCCCCCTCTAGATTGGATCTTGCTGG CAC	38

ES 2 469 092 T3

SEQ ID	Nombre	Detalle de secuencia	Tamaño de amplicón
15	BBC3-S	Biotina- GGGTTCCCTAAGGGTTGGATCCCAGACTCCTCCCT CTS	37
		Amplicón de BBC3 ligado	75
16	Mimético de diana de BBC3	GGG GGA AAT CTC GGA AGA GGG AGG AGT CTG GG	
17	BAX-L	LTCACGGTCTGCCACGCTCTAGATTGGATCTTGCTG GCAC	39
18	BAX-S	Biotina- GGGTTCCCTAAGGGTTGGA TGA GTC TAC ATGA TC CT TCCC GCCACAAAGATGGS	53
		Amplicón de BAX ligado	92
19	Mimético de diana de BAX	CGTGGCAGACCGTGACCATCTTTGTGGCGGGA	
20	3-fosforotioato de GAPDH	Biotin- GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGGACGCCTGCTTCAC CACCTTCTTGATGTCAS	51
21	sonda media 2L de GAPDH	LTCATATTTGGCAGGTTTTCTAGACGGCAGGTL	32
22	5-fosforotioato de GAPDH	SCAGGTCCACCACTGACACGTTGGCAGTTCTAGAT TGGATCTTGCTGGCAC	50
		Amplicón de 3 sondas ligado	133
24	Mimético de diana de GAPDH	ACT GCC AAC GTG TCA GTG GTG GAC CTG ACC TGC CGT CTA GAA AAA CCT GCC AAA TAT GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG GCG TC	
25	GAPDH 3-L	LTTTTCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACCAGATGAT CGACGAGACACTCTCGCCATCTAGATTGGATCTTG CTGGCAC	
26	GAPDH 3-S	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGGACCAACTCCTCGC CATATCATCTGTACACCTTCTTGATGTCATCATATT TGCCAGGTS	
27	Sonda GAPDH-3-FAM/BHQ-1 de Taqman	(FAM) ccaactcctcgccatcatctgtacaccttctg(BHQ-1)	
28	GAPDH 4-L	LTGCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTCATACTGATG ATCGACGAGACACTCTCGCCATCTAGATTGGATCT TGCTGGCAC	
29	GAPDH -4-S	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGATGGAGTTGATGCT GACGGAAGTCATAGTAAGCAGTTGGTGGTGCAGG AGGCATS	
30	Sonda GAPDH-4-QUASAR 670/BHQ-2 de Taqman	(Quasar 670) tgctgacggaagtcataagcagttggt(BHQ-2)	

SEQ ID	Nombre	Detalle de secuencia	Tamaño de amplicón
31	PCNA 2-L	LTCCTTGAGTGCCTCCAACACCTTCTTGAGGATGAT CGACGAGACACTCTCGCCATCTAGATTGGATCTTG CTGGCAC	
32	PCNA 2-S	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACGGTACAACAAGACCC AGCTGACGACTCTTAATATCCCAGCAGGCCTCGTT GATGAGGS	
33	PCNA 2-naranja 560 de Cal Fluor/BHQ-1	(rojo 610 de CAL) ctgacgactcttaatatcccaggcctcggt(BHQ-2)	
34	DDB2-2-L	LTTAGTTCCAAGATAACCTTGGTTCCAGGCTGATG ATCGACGAGACACTCTCGCCATCTAGATTGGATCT TGCTGGCAC	
35	DDB2-2-S	BiotinaGGGTTCCCTAAGGGTTGGACGTTAGACGCCA ATAGGAGTTTCACTGGTGGCTACCACCCACTGAGA GGAGAAAAGTCATS	
36	DDB2-2-(naranja 560 de CAL Fluor/BHQ-1	(naranja 560 de CAL) cgccaataggagtttactggtggctacca(BHQ-2)	
L= resto de ligamiento de dabsilo			
S= resto de fosforotioato			

Tabla 2. Concentraciones de muestra

Muestra	Concentraciones de mimético de diana
1	Todos los miméticos de diana a concentración final 10 pM
2	MOAP1, DDB2 y BBC3 a 10 pM, PCNA a 5 pM y BAX a 2 pM
3	MOAP1, DDB2 y BBC3 a 10 pM, PCNA a 1 pM y BAX a 0,5 pM

Ejemplo 2

5 Reacciones de CLPA que usan miméticos de diana de ADN y ARN de MOAP1 y DDB2

Se prepararon las reacciones por duplicado como se presenta en la Tabla 3 usando miméticos de diana de ADN o ARN para los genes MOAP1 y DDB2 y los conjuntos de sonda de CLPA diseñados para orientarse a las secuencias. Los números de sonda hacen referencia a los SEQ ID NO de la Tabla 1. Se añadieron los reactivos a las concentraciones y volúmenes mostrados en la Tabla 4. Se calentaron a 50 °C durante 60 minutos los respectivos sonda S, sonda L y mimético de diana en un tubo de PCR de 0,2 ml, después de lo cual se usaron 2,5 µl de la reacción de CLPA como molde en una reacción de PCR instantánea con 40 ciclos de amplificación. Se promediaron los datos de PCR instantánea para las muestras por duplicado y se presentan en la Tabla 3 (columna de valor de Ct). Se observaron diferencias mínimas en el valor de Ct entre los miméticos de ARN y ADN, indicando una eficacia de ligamiento de sonda similar en sustratos de ARN y ADN.

Tabla 3. Conjuntos de sondas de CLPA.

Muestra	Identificador	Sonda L (1 nM) SEQ ID NO	Sonda S (1 nM) SEQ ID NO	Mimético de diana (10 pM) SEQ ID NO	Valor de Ct
1	ADN de MOAP-1	3	4	5	19,5
2	ARN de MOAP-1	3	4	6	20
3	ADN de DDB2	10	11	12	21
4	ARN de DDB2	10	11	13	21

Tabla 4. Tabla de reactivos- ejemplo 1

1X tampón PCR*	12,5 ul
Sonda S (1 nM) y sonda L (1 nM)	2,5 ul cada uno
Mimético de diana (100 pM)	2,5 ul
Agua	5,0 ul
Calentar a 50 °C durante 1 hora	
*El tampón 1X PCR es MgCl ₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3	

5 Ejemplo 3Análisis directo de transcritos de ARN de DDB2 en tampón de lisis y sangre lisada

Se preparó ARN mensajero de DDB2 (ARNm) usando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion y un plásmido vectorial de ADNc de Origene (SC122547). Se determinó la concentración de ARNm usando el kit de ensayo PicoGreen RNA de invitrogen. Se ensayaron los conjuntos de sondas de DDB2 (Tabla 5) con diferentes concentraciones de transcrito de ARNm de DDB2 añadido a agua o sangre completa. Se enumeran los componentes de la mezcla de reacción en la Tabla 5. Las muestras 1-4 consistían en transcrito de DDB2 a 10 ng, 1 ng, 0,1 ng y 0,01 ng en agua, y las muestras 5-8 consistían en el mismo intervalo de concentración añadido a sangre completa. Se siguieron protocolos de reacción similares, con la excepción de añadir proteinasa K a las muestras de sangre para reducir la coagulación de proteína. El procedimiento es como sigue: Se añadieron los reactivos a las concentraciones y volúmenes de la Tabla 5. Se calentaron a 80 °C durante 5 minutos las sondas S, transcrito de ARNm, tampón de lisis de hidrocloreuro de guanidina y agua (muestras 1-4) o sangre completa (muestras 5-8) y se movieron entonces a un bloque calentado a 55 °C. Se añadieron sonda L, tampón de lavado, perlas de estreptavidina y proteinasa K, y se incubó la reacción a 55 °C durante 60 minutos. Se retiraron las muestras del bloque calentado y se capturaron las perlas magnéticas usando una placa de captura magnética Dynal MPC 96S. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las perlas 3 veces con tampón de lavado. Se añadieron mezcla maestra de PCR DyNamo SYBR green (25 ul, 1x) y cebadores universales (SEQ ID NO 1 y 2, 300 nM) a las perlas y se termociclaron las muestras usando un instrumento de PCR instantánea Stratagene MX4000 durante 30 ciclos (95 °C durante 15 minutos, 30 ciclos de 95 °C (10 s), 60 °C (24 s), 72 °C (10 s)). Se registraron los valores de Ct y se inyectaron las muestras amplificadas en un Agilent Bioanalyzer 2100 para verificar la longitud de los amplicones. Todos los amplicones mostraron el tamaño correcto (□96 pb) y el desempeño era comparable para las muestras de sangre y agua, demostrando la capacidad de analizar directamente ARN en sangre lisada. Se resumen los resultados en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 5. Conjuntos de sondas de CLPA.

Muestra	Identificador	Sonda L (1 nM)	Sonda S (1 nM)	Transcrito de ARN
1-8	DDB2	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	Plásmido SC122547 de Origene

Tabla 6. Mezcla de reacción de DDB2

Muestras	1-4	5-8
Tampón de lisis GuHCL (2X)	12,5 µl	12,5 µl
Sonda S (5 nM)	1 µm	1 µl
Transcrito de ARN (de 10 ng/ul a 0,01 ng/ul)	1 µl	1 µl
Sangre completa	0 µl	12,5 µl
Agua	12,5 ul	0 µl
Calentar a 80 °C durante 5 min, enfriar en hielo		
Tampón de lavado	20 µl	15 µl
Sonda L (5 nM)	1 µl	1 µl
Perlas Dynal M-270	2 µl	2 µl
Proteinasa K (10 mg/ml)	0 µl	5 µl
Total	50 µl	50 µl
Incubar a 55 °C durante 60 min.		
a) El tampón de lisis GuHCL (1X) es GuHCL 3 M, EDTA 20, DTT 5 mM, 1,5% de Triton, Tris 30 mM, pH 7,2		
b) El tampón de lavado es Tris 100 mM (pH 7,4), 0,01 % de Triton.		

5 Tabla 7. Resumen de resultados de agua frente a sangre

Ensayo	Conc. de DDB2	Valor de Ct	Muestra
1	10 ng	13,5	Agua
2	1 ng	17	Agua
3	0,1 ng	20,2	Agua
4	0,01 ng	24	Agua
5	10 ng	13,5	Sangre
6	1 ng	16	Sangre
7	0,1 ng	19,2	Sangre

ES 2 469 092 T3

Ensayo	Conc. de DDB2	Valor de Ct	Muestra
8	0,01 ng	23.5	Sangre

Ejemplo 4

Ensayo de CLPA-CE de 3 sondas

5 Se prepararon reacciones por duplicado como se presenta en la Tabla 8, usando la sonda mimética de diana de ADN de SEQ ID NO 23 y el conjunto de sondas de CLPA de 3 sondas (SEQ ID NO 20, 21 y 22). Los números de sonda hacen referencia a los SEQ ID NO de la Tabla 1. Se añadieron los reactivos a las concentraciones y volúmenes de la Tabla 9. Se calentaron a 50 °C durante 60 minutos los respectivos sondas S, sonda L y miméticos de diana en un tubo de PCR de 0,2 ml, después de lo cual se usaron 2,5 µl de la reacción de CLPA como molde en una reacción de PCR Dynamo SYBR green con 25 ciclos de amplificación. Se promediaron los datos de PCR instantánea para las muestras por duplicado y se presentan en la Tabla 8 (columna de valor de Ct). Se analizó entonces una muestra de 1 µl de cada reacción mediante un Agilent Bioanalyzer 2100 para determinar el tamaño del producto de reacción.

Tabla 8. Conjuntos de sondas de CLPA.

Muestras	Identificador	Sonda 3'-S SEQ ID NO	Sonda 2L SEQ ID NO	Sonda 5'-S SEQ ID NO	Mimético de diana SEQ ID NO	Tamaño de amplión	Valor de Ct
1 y 2	GAPDH	20	21	22	23	Aproximadamente 135 pb	16,3
3 y 4	Negativo	20	21	22	23	Ninguno observado	Sin CT

Sondas a concentración 1 nM; mimético de diana a concentración 10 pM.

15 Tabla 9. Tabla de reactivos- ejemplo 1

1X tampón PCR*	12,5 µl
Sonda S 3' y 5' (10 nM) y sonda 2L (10 nM)	2,5 µl cada una
Mimético de diana (1 nM)	2,5 µl
Agua	2,5 µl
Calentar a 50 °C durante 1 hora	
*El tampón 1X PCR es MgCl ₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3	

Ejemplo 5

Detección por CLPA instantánea múltiple de ARNm

20 Se añadieron a un tubo de PCR de 0,2 ml 4 conjuntos de reactivos de CPLA que se habían genomanipulado para poseer sitios de unión únicos para sondas marcadas duales con diferentes colores. Se prepararon las reacciones como se indica en la Tabla 10 y en la Tabla 11. Los conjuntos de sondas de CLPA y sondas marcadas duales corresponden a las SEQ ID NO 25 a 36 en la Tabla 1. Se añadieron el ARNm de S y de transcrito por separación (GAPDH, PCNA y DDB2) a tampón de lisis 2X (el tampón de lisis GuHCL (1X) es GuHCL 3 M, EDTA 20 mM, DTT 5 mM, 1,5 % de Triton, Tris 30 mM, pH 7,2) y se calentó a 80 °C durante 5 min. Se enfriaron las muestras en hielo y se añadieron perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (DYNAL M-270) y sonda L. Se calentaron las muestras a 50 °C durante 1 hora. Se capturaron las perlas magnéticas en una placa DYNAL MPC y se lavaron dos veces con

5 tampón de lavado. Se recapturaron las perlas y se añadió mezcla maestra Dynamo PCR 1x con 4 sondas marcadas duales diferentes y cebadores de PCR universales (25 μ l de volumen total). Se termociclaron las muestras usando un instrumento de PCR instantánea Stratagene MX4000 durante 30 ciclos (95 °C durante 15 minutos, 30 ciclos a 95 °C (10 s), 60 °C (24 s), 72 °C (10 s)) con filtros apropiados para monitorizar la fluorescencia en los canales de FAM, naranja 560 de Cal Fluor, rojo 610 de Cal Fluor y Quasar 670. Se registraron los valores de Ct observados para cada canal y se indican en la Tabla 10.

Tabla 10. Reactivos múltiples usados en el ejemplo 5

Muestras	Sondas S (25 pM) SEQ ID NO	Sondas L (25 pM) SEQ ID NO	Dianas	Ct (FAM)- GAPDH3	Ct (560)- DDB2	Ct (610)- PCNA	Ct (670)- GAPDH4
1 y 2	26, 29, 32,35	25, 28, 31, 34	250 ng de ARNt de levadura; 40 pg de ARNm de GAPDH (Origene SC 118869), 40 pg de PCNA (SC 118528) y 40 pg de DDB2 (SC122547)	25,5	24,5	24,8	25,8
3 y 4	26, 29, 32,35	25, 28, 31, 34	250 ng de ARNt de levadura (negativo)	Sin CT	Sin CT	Sin CT	Sin CT
5 y 6	26, 29, 32,35	25, 28, 31,34	250 ng de ARNt de levadura; 40 pg de ARNm de GAPDH (Origene SC118869), 40 pg de PCNA (SC1118528) y 40 pg de DDB2 (SC122547)	22,1	24,5	22,1	22.2
7 y 8	26, 29, 32, 35	25, 28, 31, 34	250 ng de ARNt de levadura (negativo)	Sin CT	Sin CT	Sin CT	Sin CT

Tabla 11. Reactivos adicionales usados en el ejemplo 5

Tampón de lisis GuHCL (2X)	12,5 μ l
Sondas S (solución madre 0,25 nM de cada una)	5 μ l
ARNm (250 ng de ARNt +/- ARNm)	5 μ l
Agua	2,5 μ l
Calentar a 80 °C durante 5 min, enfriar en hielo	
Agua	18 μ l
Sondas L (solución madre 0,25 nM de cada una)	5 μ l
Perlas	2 μ l
Total	50 μ l
Incubar a 50 °C durante 1 hora	

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:
 - a) proporcionar
 - 5 i. un sustrato de ligamiento que comprende una secuencia de ácido nucleico diana que comprende al menos un primer dominio diana y un segundo dominio diana, en el que el ácido nucleico diana es una muestra bruta;
 - ii. una primera sonda de ligamiento; y
 - iii. una segunda sonda de ligamiento,

10 en el que la primera sonda de ligamiento comprende un primer dominio de sonda sustancialmente complementario del primer dominio de diana y un resto de ligamiento 5'; en el que la segunda sonda de ligamiento comprende un segundo dominio de sonda sustancialmente complementario del segundo dominio de diana y un resto de ligamiento 3'; y en el que una o ambas de las sondas contienen una secuencia espaciadora variable con longitudes diferentes para cada secuencia de ácido nucleico diana;
 - 15 b) ligar la primera y segunda sondas de ligamiento en ausencia de enzima ligasa añadida exógenamente, formando un producto de ligamiento; en el que el producto de ligamiento tiene una longitud específica de diana que surge de la secuencia espaciadora variable, en el que el ligamiento ocurre en presencia de proteinasa K;
 - c) amplificar el producto de ligamiento; y
 - d) detectar el producto de ligamiento.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que una o ambas de las sondas de ligamiento comprenden una secuencia cebadora.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia de ácido nucleico diana es ARN.
4. El método de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que las sondas de ligamiento son de ADN.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra bruta comprende sangre completa.
- 25 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra bruta comprende una muestra embebida en parafina.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el producto de ligamiento se detecta por electroforesis capilar.
8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el producto de ligamiento se detecta usando un espectrómetro de masas.
- 30 9. El uso de una etapa de ligamiento efectuada en ausencia de enzima ligasa añadida exógenamente en la detección de una pluralidad de ácidos nucleicos diana en una muestra; comprendiendo el uso las etapas de:
 - 35 a) proporcionar una muestra que comprende un sustrato de ligamiento, comprendiendo el sustrato los ácidos nucleicos diana, cuyas secuencias comprenden al menos un primer dominio diana y un segundo dominio diana, en el que los ácidos nucleicos diana están en una muestra bruta;
 - b) proporcionar
 - i. una primera sonda de ligamiento; y
 - ii. una segunda sonda de ligamiento,

40 en el que la primera sonda de ligamiento comprende un primer dominio de sonda sustancialmente complementario del primer dominio de diana y un resto de ligamiento 5'; en el que la segunda sonda de ligamiento comprende un segundo dominio de sonda sustancialmente complementario del segundo dominio de diana y un resto de ligamiento 3'; y en el que una o ambas de las sondas contienen:

una secuencia espaciadora variable con longitudes diferentes para cada secuencia de ácido nucleico diana;
 - 45 c) efectuar la etapa de ligamiento ligando las primeras y segunda sondas de ligamiento con el sustrato de ligamiento en ausencia de enzima ligasa añadida exógenamente, formando un producto de ligamiento; en el

que el producto de ligamiento tiene una longitud específica de diana que surge de la secuencia espaciadora variable, en el que la etapa de ligamiento ocurre en presencia de proteinasa K;

d) amplificar el producto de ligamiento; y

e) detectar el producto de ligamiento.

- 5 10. La materia de cualquier reivindicación precedente, en la que el ligamiento ocurre espontáneamente sin la adición de reactivos ni estímulos adicionales.

Ensayo de CLPA

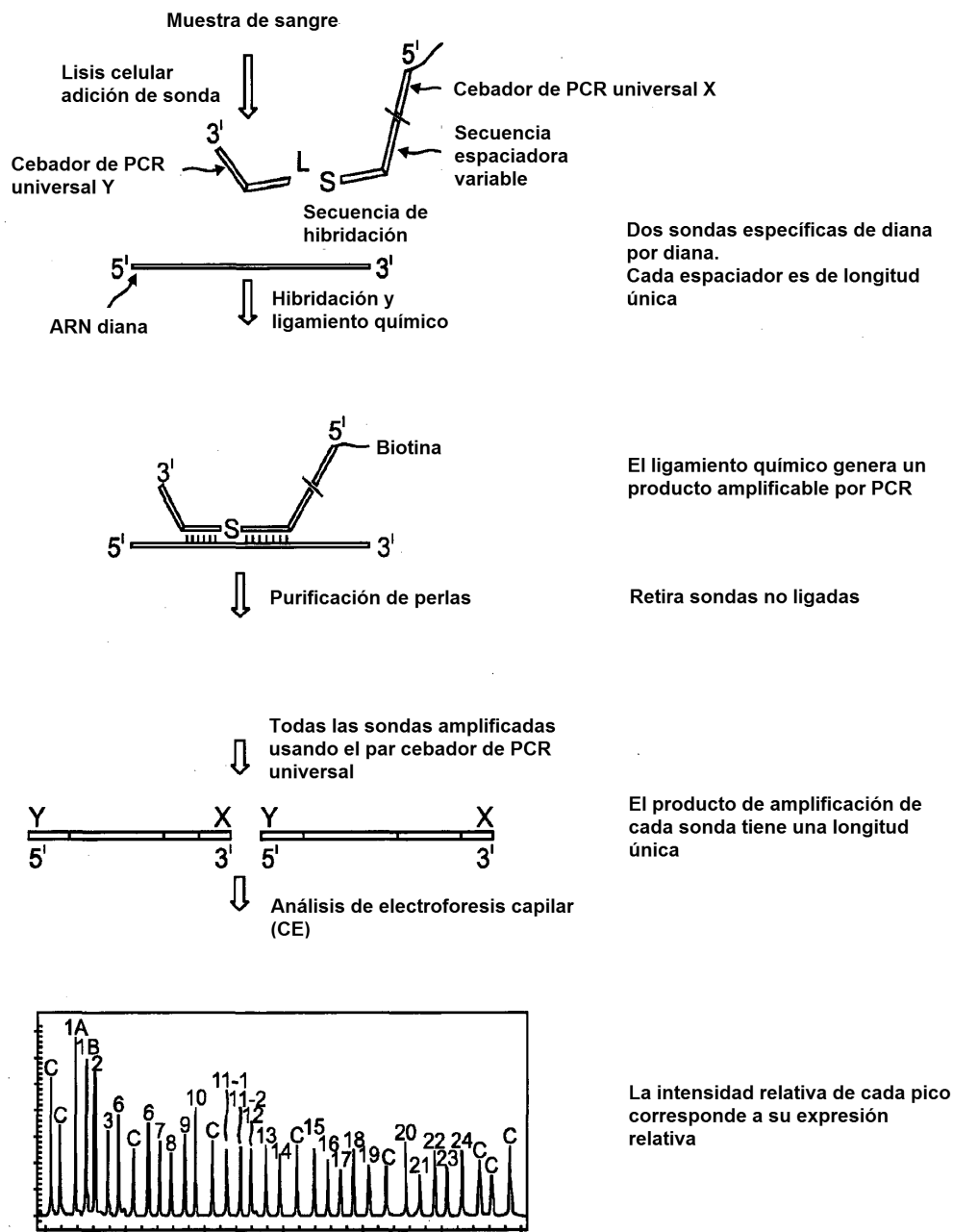


FIG. 1

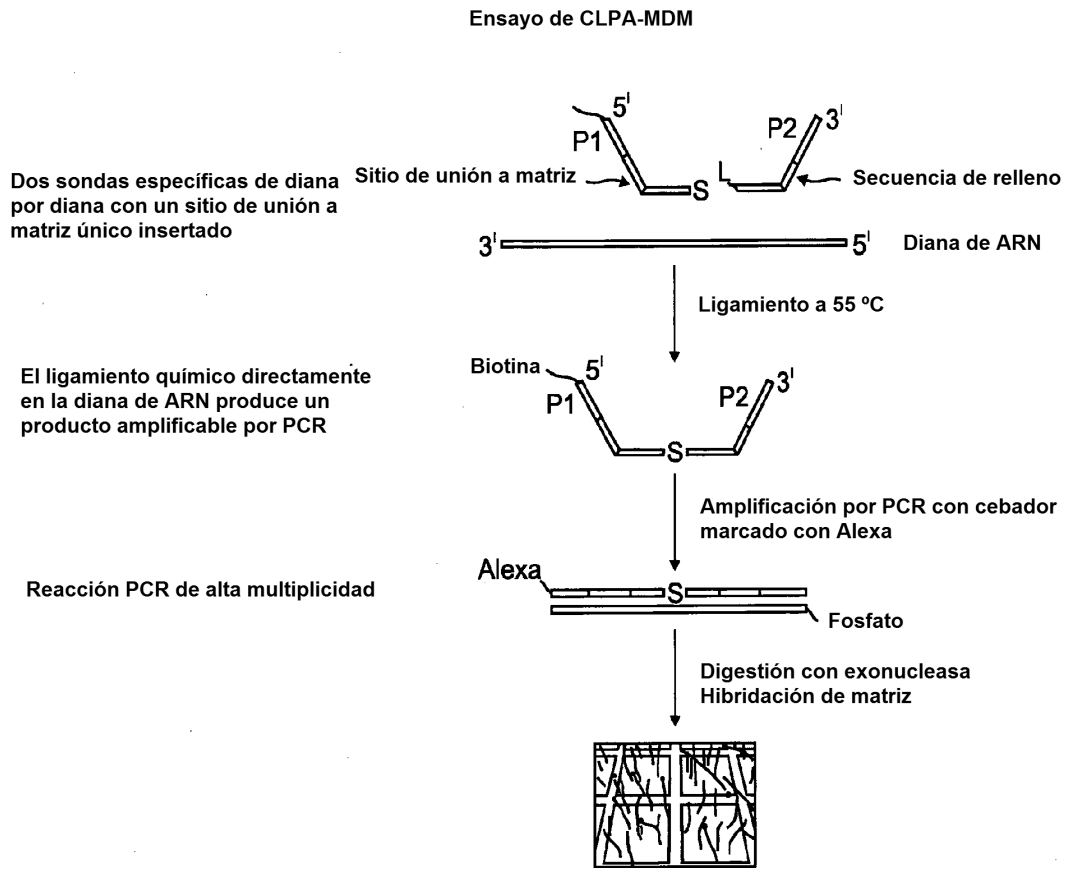


FIG. 2

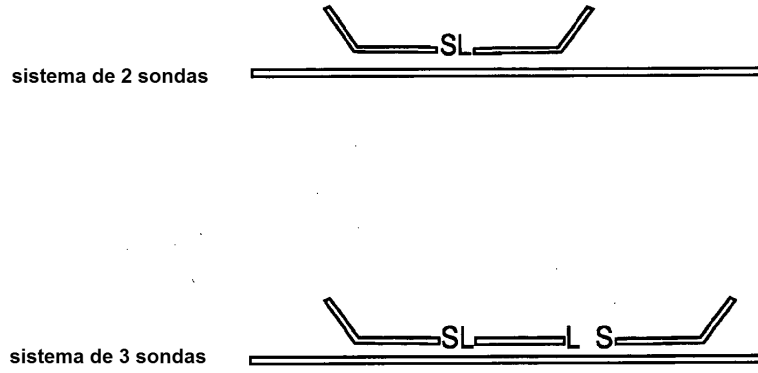
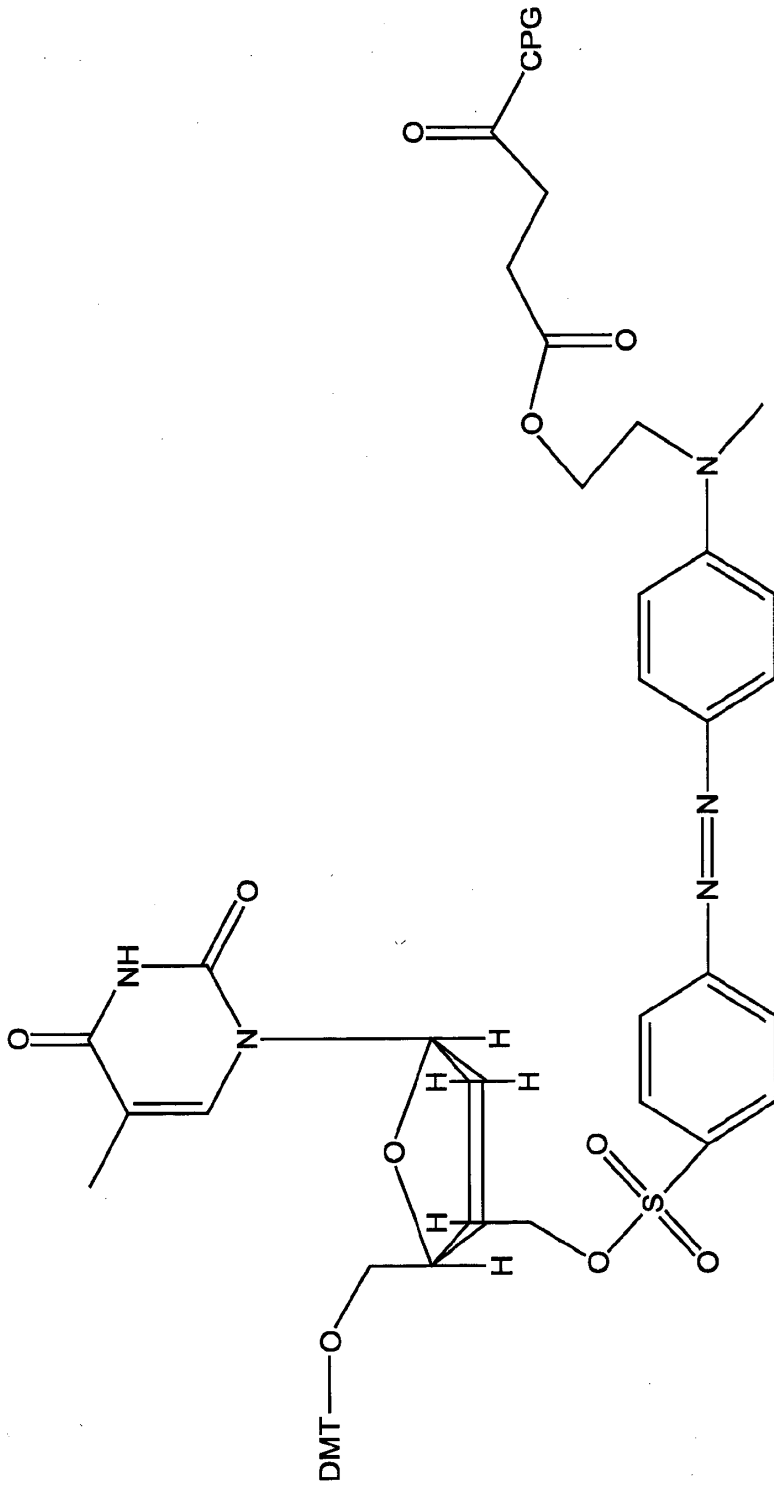


FIG. 3



CPG= vidrio de poro de control
DMT= bis-(4-metoxifenil)fenilmetilo

FIG. 4

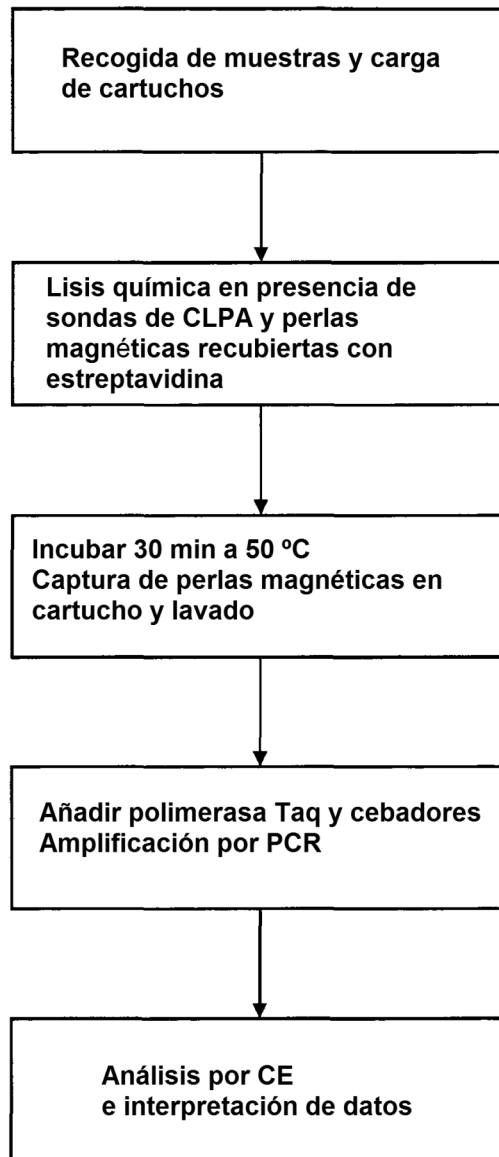


FIG. 5

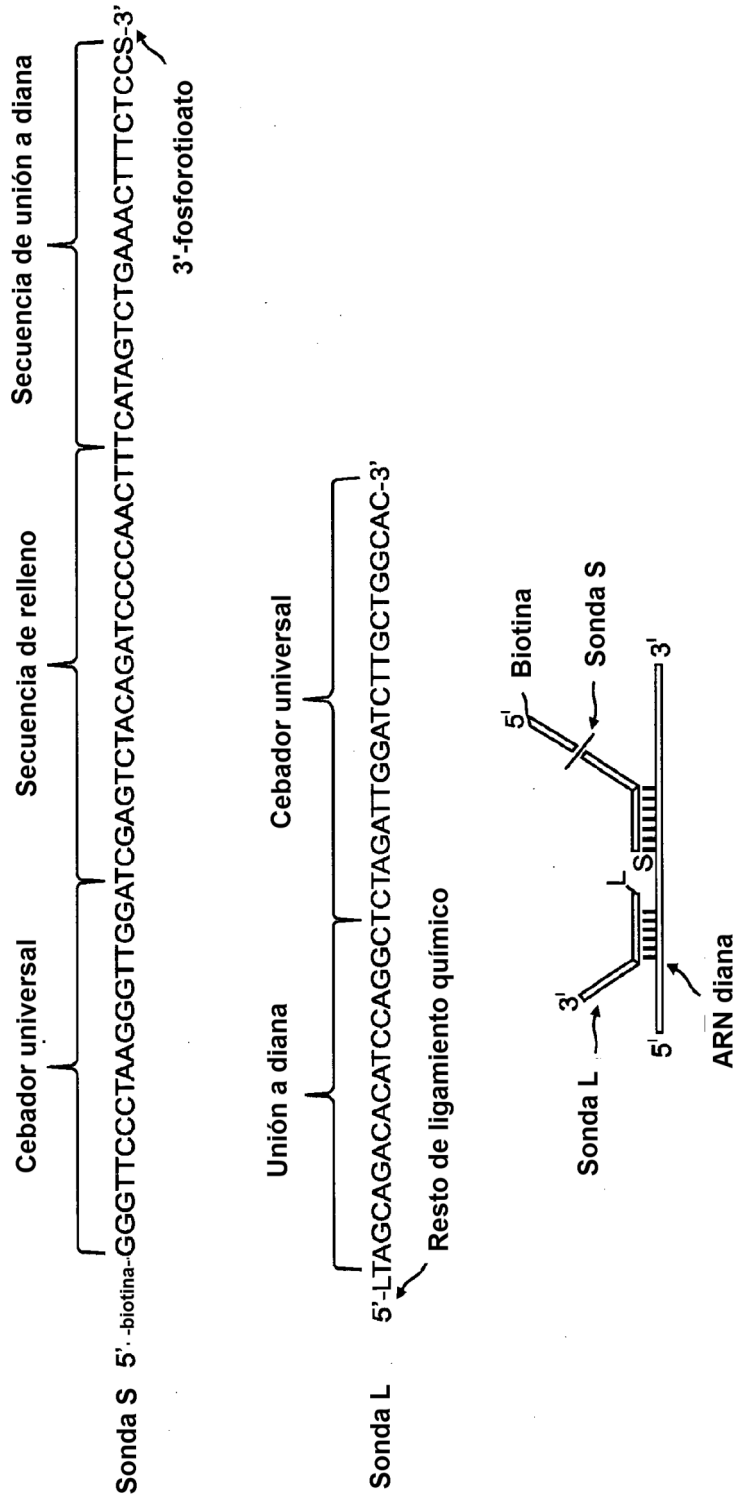


FIG. 6

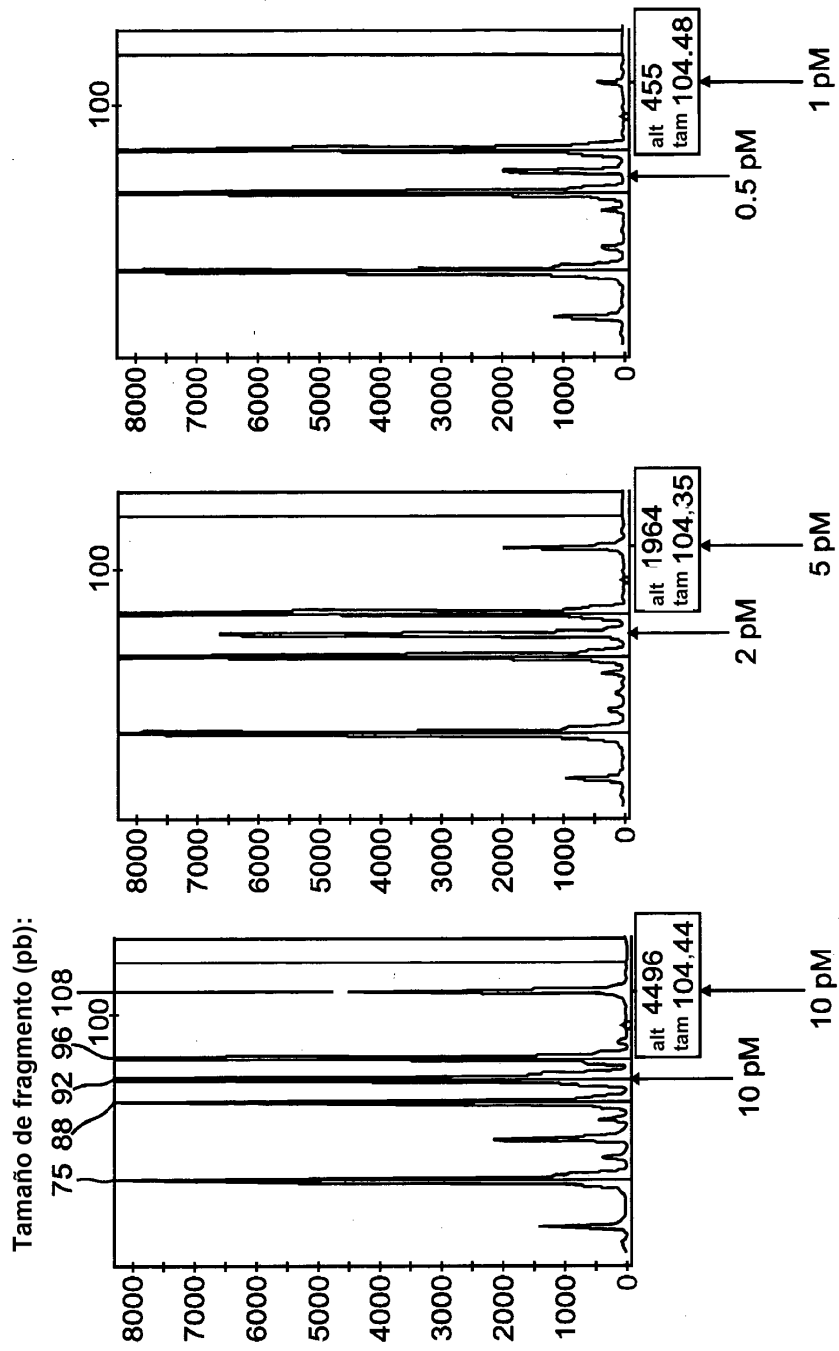


FIG. 7

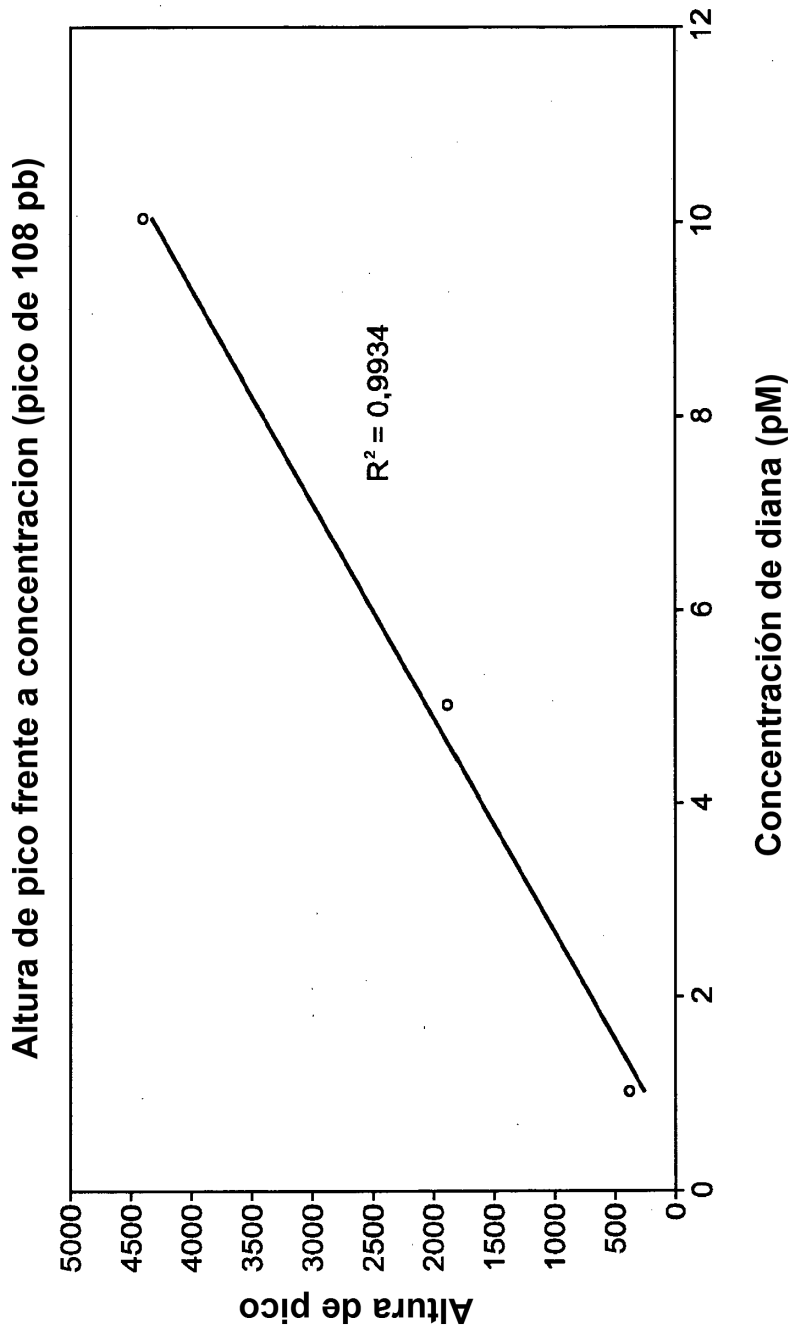


FIG. 8