

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 344**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/EP2014/078418**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15091765**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14828024 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 3083996**

54 Título: **Identificación multiplexada de ácidos nucleicos diana por escisión de sonda basada en estructura**

30 Prioridad:

**20.12.2013 US 201361918898 P**

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

**26.11.2018**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GUPTA, AMAR**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 691 344 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

Identificación multiplexada de ácidos nucleicos diana por escisión de sonda basada en estructura

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la detección de ácidos nucleicos. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para realizar una detección múltiplex de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana.

10 **Antecedentes de la invención**

Se conocen muchos procedimientos para la detección de ácidos nucleicos diana. Los ensayos homogéneos disponibles actualmente para la detección de ácidos nucleicos incluyen los ensayos TaqMan®, Ampliflour®, de fijación de colorante, PCR cinética selectiva de alelos y de cebadores Scorpion®. Estos procedimientos de ensayo no se multiplexan fácilmente debido a la necesidad de detectar un colorante diferente para cada ácido nucleico diana y, por lo tanto, están limitados en su potencial de mejora. Para superar dichas limitaciones, varios estudios recientes han divulgado el uso de sondas oligonucleotídicas que contienen una parte de "marcador" escindible que se puede separar y detectar fácilmente (por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0053939, patente de EE. UU. n.º 8.133.701). Sin embargo, los resultados de estos estudios muestran que aún existen problemas para poder correlacionar con precisión los marcadores de detección con el ácido nucleico diana y todavía existe la necesidad de un procedimiento preciso para realizar una detección múltiplex de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un novedoso procedimiento para la detección de secuencias de ácidos nucleicos. En este procedimiento, durante la PCR se produce un fragmento de escisión identificador único, procedente de una sonda oligonucleotídica, unido a un ácido nucleico diana dentro de la región de amplificación, por la actividad nucleasa en dirección 5' de la ADN polimerasa. Esto se logra al tener una región "Flap" no complementaria unida al extremo 5' de la sonda. La identidad del ácido nucleico diana se puede determinar identificando el fragmento de escisión único mediante separación basada en la longitud, separación basada en la carga o mediante la masa. Por ejemplo, esto se puede realizar fácilmente mediante espectroscopia de masas. Debido al número extremadamente elevado de posibles fragmentos de escisión con masas únicas y fácilmente resolubles, se hace posible de este modo una detección múltiplex rápida de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana usando sondas de códigos de barras y espectrometría de masas.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende las etapas de:

40 (a) poner en contacto una muestra que comprende un ácido nucleico diana con (i) un par de cebadores oligonucleotídicos, en el que un primer cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana y ceba la síntesis de un primer producto de extensión, y en el que un segundo cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en el primer producto de extensión y ceba la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria del primer producto de extensión, y (ii) una sonda oligonucleotídica que comprende al menos dos partes distintas, en la que una primera parte comprende nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria de una región de la secuencia del ácido nucleico diana en la que la primera parte hibrida dentro de la secuencia de ácido nucleico diana unida por el par de cebadores oligonucleotídicos, y en la que la primera parte está bloqueada en el extremo 3' para prohibir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico; y una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte que comprende nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, en la que la segunda parte se separa de la primera parte mediante un conector no nucleotídico derivado de una única unidad o de múltiples unidades separadas por enlaces fosfato, en la que el conector crea una región desestabilizada en la unión de la primera parte y la segunda parte;

55 (b) amplificar la secuencia de ácido nucleico diana con una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3' en condiciones que permiten la hibridación del par de cebadores oligonucleotídicos y la sonda oligonucleotídica con la secuencia de ácido nucleico diana y la síntesis de productos de extensión del cebador a partir del par de cebadores oligonucleotídicos mientras que la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de la polimerasa de ácido nucleico es capaz de escindirse y liberarse de la sonda oligonucleotídica hibridada, comprendiendo un fragmento predominante la segunda parte de la sonda oligonucleotídica, el conector no nucleotídico y un único nucleótido en el extremo 5' de la primera parte de la sonda oligonucleotídica; y

60 (c) detectar la presencia o ausencia del fragmento predominante por espectrometría de masas, detectando de este modo la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra.

En algunos modos de realización se detectan dos o más ácidos nucleicos diana en una única reacción multiplexada. En determinados modos de realización se usan dos o más sondas oligonucleotídicas para detectar los dos o más ácidos nucleicos diana en la única reacción multiplexada. En algunos modos de realización, el conector no nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en propanodiol, hexaetilenglicol (HEG), trietilenglicol (TEG), Spacer Phosphoramidite 9, Spacer C12 CE Phosphoramidite y dSpacer CE Phosphoramidite, o combinaciones de los mismos. En determinados modos de realización, el conector no nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en propanodiol y HEG. En algunos modos de realización, la detección se realiza mediante un espectrómetro de masas, seleccionado del grupo que consiste en desorción/ionización por láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), EM, EM en tándem, ionización por electrospray y analizador de tiempo de vuelo (ESI-TOF), ESI-iontrap, cromatografía líquida (CL)-EM, cromatografía de gases (CG)-EM y EM por movilidad iónica (MI). En algunos modos de realización, la polimerasa de ácido nucleico es una ADN-polimerasa termoestable.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una sonda oligonucleotídica en la que la sonda oligonucleotídica comprende al menos dos partes distintas, en la que una primera parte comprende nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria de una región de una secuencia del ácido nucleico diana de modo que la primera parte es capaz de unirse a la región de la secuencia del ácido nucleico diana y en la que dicha primera parte está bloqueada en el extremo 3' para prohibir la extensión de la sonda oligonucleotídica por una ADN-polimerasa; y una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte que comprende nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana; en la que la primera parte y la segunda parte se separan mediante un conector no nucleotídico derivado de una única unidad o de múltiples unidades separadas por enlaces fosfato, en la que el conector crea una región desestabilizada en la unión de la primera parte y la segunda parte de la sonda oligonucleotídica.

En algunos modos de realización, el conector no nucleotídico en la unión de la primera parte y la segunda parte de la sonda oligonucleotídica se selecciona del grupo que consiste en propanodiol, hexaetilenglicol (HEG), trietilenglicol (TEG), Spacer Phosphoramidite 9 (Glen Research, ref. catálogo 10-1909-90), Spacer C12 CE Phosphoramidite (Glen Research, ref. catálogo 10-1928-90) y dSpacer CE Phosphoramidite (Glen Research, ref. catálogo 10-1914-90) o unidades múltiples o combinaciones de estos.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa una descripción ilustrativa de los procedimientos de la presente invención.

La FIG. 2 muestra un espectrograma de masas del experimento descrito en el ejemplo 1.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

El término "muestra" como se utiliza en el presente documento incluye una muestra o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos) que incluye ácidos nucleicos. El término "muestra" también pretende incluir muestras tanto biológicas como ambientales. Una muestra puede incluir una muestra de origen sintético. Las muestras biológicas incluyen sangre completa, suero, plasma, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido de lavado (por ejemplo, broncoalveolar, gástrico, peritoneal, ductal, ótico, artroscópico), pieza de biopsia, orina, heces, esputo, saliva, mucosa nasal, líquido prostático, semen, líquido linfático, bilis, lágrimas, sudor, leche materna, líquido mamario, células embrionarias y células fetales. En un modo de realización preferente, la muestra biológica es sangre, y más preferentemente plasma. Como se usa en el presente documento, el término "sangre" abarca sangre completa o cualquier fracción de sangre, tal como suero y plasma como se define convencionalmente. Plasma sanguíneo se refiere a la fracción de sangre total resultante de la centrifugación de la sangre tratada con anticoagulantes. Suero sanguíneo se refiere a la parte acuosa de líquido que queda después de que una muestra de sangre se haya coagulado. Las muestras ambientales incluyen material ambiental, tal como material de superficie, suelo, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables de procesamiento de alimentos y productos lácteos. Estos ejemplos no se deben interpretar como limitantes de los tipos de muestras aplicables a la presente invención.

Los términos "diana" o "ácido nucleico diana" como se usan en el presente documento pretenden significar cualquier molécula cuya presencia se va a detectar o medir o cuya función, interacciones o propiedades se van a estudiar. Por lo tanto, una diana incluye esencialmente cualquier molécula para la cual existe una sonda detectable (por ejemplo, sonda oligonucleotídica) o ensayo, o que puede producir un experto en la técnica. Por ejemplo, una diana puede ser una biomolécula, tal como una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un lípido o un carbohidrato, que es capaz de unirse a una sonda detectable (por ejemplo, un anticuerpo) o entrar de otra manera en contacto con ella, en la que la sonda detectable también comprende ácidos nucleicos capaces de ser detectados por procedimientos de la invención. Como se usa en el presente documento, "sonda detectable" se refiere a cualquier molécula o agente

capaz de hibridar o asociarse con una biomolécula diana de interés y permite la detección específica de la biomolécula diana como se describe en el presente documento. En un aspecto de la invención, la diana es un ácido nucleico y la sonda detectable es un oligonucleótido. Los términos "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se pueden usar indistintamente a lo largo de la divulgación. Los términos se refieren a oligonucleótidos, oligos, polinucleótidos, desoxirribonucleótidos (ADN), ADN genómico, ADN mitocondrial (ADNmt), ADN complementario (ADNc), ADN bacteriano, ADN vírico, ARN vírico, ARN, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN catalítico, clones, plásmidos, M13, P1, cósmido, cromosoma artificial de bacteria (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC), ácido nucleico amplificado, amplicón, producto de PCR y otros tipos de ácido nucleico amplificado, híbridos ARN/ADN y ácidos nucleicos de poliamida (PNA), todos los cuales pueden estar en forma monocatenaria o bicatenaria y, a menos que se limiten de otro modo, abarcarían análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de manera similar a los nucleótidos naturales y combinaciones y/o mezclas de los mismos. Por lo tanto, el término "nucleótidos" se refiere tanto a nucleótidos naturales como modificados o que no ocurren naturalmente, incluyendo nucleósidos tri, di y monofosfatos, así como monómeros monofosfato presentes en el ácido polinucleico u oligonucleótido. Un nucleótido también puede ser un ribo; 2'-desoxi; 2',3'-desoxi, así como una amplia gama de otros miméticos de nucleótidos que son bien conocidos en la técnica. Los miméticos incluyen nucleótidos de terminación de cadena, tales como sustituciones 3'-O-metilo, de bases halogenadas o glucídicas; estructuras glucídicas alternativas que incluyen estructuras de anillo de alquilo no glucídicas; bases alternativas incluyendo inosina; deaza modificado; chi y psi, modificadas con conector; modificadas con marcador de masa; modificaciones o sustituciones de fosfodiéster, incluyendo fosforotioato, metilfosfonato, boranofosfato, amida, éster, éter; y una sustitución internucleotídica básica o completa, incluyendo enlaces por escisión tales como restos nitrofenilo fotoescindibles.

La presencia o ausencia de una diana se puede medir cuantitativa o cualitativamente. Las dianas se pueden presentar en una variedad de formas diferentes incluyendo, por ejemplo, mezclas simples o complejas, o en formas sustancialmente purificadas. Por ejemplo, una diana puede formar parte de una muestra que contiene otros componentes o puede ser el componente único o principal de la muestra. Por lo tanto, una diana puede ser un componente de una célula o tejido completo, un extracto de célula o tejido, un lisado fraccionado del mismo o una molécula sustancialmente purificada. Además, una diana puede tener una secuencia o estructura conocida o desconocida.

El término "reacción de amplificación" se refiere a cualquier medio *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia diana de ácido nucleico.

"Amplificación" se refiere a una etapa en la que una solución se somete a condiciones suficientes para permitir la amplificación. Los componentes de una reacción de amplificación pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, cebadores, una plantilla de polinucleótido, polimerasa, nucleótidos, dNTP y similares. El término "amplificación" se refiere típicamente a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico diana. Sin embargo, "amplificación" como se usa en el presente documento también se puede referir a aumentos lineales en el número de una secuencia diana seleccionada de ácido nucleico, pero es diferente de una etapa única de extensión de un cebador único.

"Reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento mediante el cual un segmento o subsecuencia específico de un ADN bicatenario diana se amplifica en una progresión geométrica. La PCR es bien conocida por los expertos en la técnica; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.683.195 y 4.683.202; y protocolos de PCR: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, eds, 1990.

"Oligonucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a oligómeros lineales de monómeros nucleosídicos naturales o modificados unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos. Los oligonucleótidos incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas anoméricas de los mismos, ácidos peptidonucleicos (APN) y similares, capaces de unirse específicamente a un ácido nucleico diana. Normalmente, los monómeros están unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, 3-4, hasta varias decenas de unidades monoméricas, por ejemplo, 40-60. Cada vez que un oligonucleótido se representa por una secuencia de letras, tal como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5'-3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitidina, "G" indica desoxiguanosina, "T" indica desoxitimidina, y "U" indica el ribonucleósido uridina, a menos que se indique lo contrario. Normalmente, los oligonucleótidos comprenden los cuatro desoxinucleótidos naturales; sin embargo, también pueden comprender ribonucleósidos o análogos nucleotídicos no naturales. Cuando una enzima tiene requisitos de sustratos oligonucleotídicos o polinucleotídicos específicos para la actividad, por ejemplo, ADN monocatenario, dúplex ARN/ADN o similar, la selección de la composición apropiada para los sustratos oligonucleotídicos o polinucleotídicos es bien conocida por un experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, "cebador oligonucleotídico" o, simplemente, "cebador" se refiere a una secuencia polinucleotídica que hibrida con una secuencia en una plantilla de ácido nucleico diana y facilita la detección de una sonda oligonucleotídica. En modos de realización de amplificación de la invención, un cebador oligonucleotídico sirve como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico. En modos de realización sin amplificación, se puede usar un cebador oligonucleotídico para crear una estructura que sea capaz de ser escindida

por un agente de escisión. Los cebadores pueden ser de una variedad de longitudes y tienen a menudo menos de 50 nucleótidos de longitud, por ejemplo 12-25 nucleótidos de longitud. La longitud y las secuencias de cebadores para uso en PCR se pueden diseñar basándose en principios conocidos por los expertos en la técnica.

5 El término "sonda oligonucleotídica" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia polinucleotídica capaz de hibridar o asociarse con un ácido nucleico diana de interés y permite la detección específica del ácido nucleico diana.

10 "Nucleótido con emparejamiento erróneo" o "emparejamiento erróneo" se refiere a un nucleótido que no es complementario de la secuencia diana en esa posición o posiciones. Una sonda oligonucleotídica puede tener al menos un emparejamiento erróneo, pero también puede tener 2, 3, 4, 5, 6 o 7 o más nucleótidos con emparejamiento erróneo.

15 El término "polimorfismo" como se usa en el presente documento se refiere a una variante alélica. Los polimorfismos pueden incluir polimorfismos mononucleotídicos (SNP), así como polimorfismos de longitud de secuencia simple. Un polimorfismo se puede deber a una o más sustituciones de nucleótidos en un alelo en comparación con otro alelo o se puede deber a una inserción o deleción, duplicación, inversión y otras alteraciones conocidas en la técnica.

20 El término "tamaño de masa distinguible" como se usa en el presente documento se puede usar de manera intercambiable con "tamaño de producto de escisión", "tamaño de producto de degradación" o "tamaño de fragmento de sonda" y se refiere al tamaño de un producto de degradación predominante resultante de la escisión y liberación de la sonda oligonucleotídica, como se describe en los procedimientos en el presente documento. Los fragmentos que tienen tamaños de masa distinguible (MDF) pueden incluir, pero no se limitan a, fragmentos de sondas oligonucleotídicas, fragmentos de sondas oligonucleotídicas nucleotídicos, fragmentos de sondas oligonucleotídicas no nucleotídicas, fragmentos de sondas oligonucleotídicas que contienen marcadores de modificación para facilitar la separación (por ejemplo, restos hidrófobos y de afinidad). La producción de un fragmento con un tamaño único de masa distinguible da lugar a una sensibilidad significativamente mejorada y permite una mayor capacidad para realizar una reacción múltiple.

30 El término "modificación" como se usa en el presente documento se refiere a alteraciones de la sonda oligonucleotídica a nivel molecular (por ejemplo, resto de base, resto glucídico o cadena principal de fosfato). Las modificaciones de nucleósidos incluyen, pero no se limitan a, la introducción de bloqueadores de la escisión o inductores de la escisión, la introducción de ligantes del surco menor, el enriquecimiento isotópico, el agotamiento isotópico, la introducción de deuterio y modificaciones de halógeno. Las modificaciones de nucleósidos también pueden incluir restos que aumentan la rigurosidad de la hibridación o aumentan la temperatura de fusión de la sonda oligonucleotídica. Por ejemplo, una molécula de nucleótido se puede modificar con un puente adicional que conecte los carbonos 2' y 4' para dar un nucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA) que sea resistente a la escisión por una nucleasa.

40 El término "específico" o "especificidad" en referencia a la unión de una molécula con otra molécula, tal como una sonda para un polinucleótido diana, se refiere al reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre las dos moléculas, junto con reconocimiento, contacto o formación de complejo sustancialmente menores de esa molécula con otras moléculas. Como se usa en el presente documento, el término "hibridar" o "asociarse" se refiere a la formación de un complejo estable entre dos moléculas.

45 Una sonda es "capaz de hibridar" con una secuencia de ácido nucleico si al menos una región de la sonda comparte una identidad de secuencia sustancial con al menos una región del complemento de la secuencia de ácido nucleico. "Identidad de secuencia sustancial" es una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o 99 %, y lo más preferentemente un 100 %. Con el fin de determinar la identidad de secuencia de una secuencia de ADN y una secuencia de ARN, U y T se consideran a menudo el mismo nucleótido. Por ejemplo, una sonda que comprende la secuencia ATCAGC es capaz de hibridar con una secuencia de ARN diana que comprende la secuencia GCUGAU.

55 El término "agente de escisión" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier medio que sea capaz de escindir una sonda oligonucleotídica para producir fragmentos de tamaños de masa distinguible, incluyendo pero sin limitarse a enzimas. Para los procedimientos en los que no se produce amplificación, el agente de escisión puede servir únicamente para escindir, degradar o liberar de otro modo la segunda parte de la sonda oligonucleotídica o fragmentos de la misma. El agente de escisión puede ser una enzima. El agente de escisión puede ser natural, sintético, no modificado o modificado.

65 Para los procedimientos en los que se produce amplificación, el agente de escisión es preferentemente una enzima que posee actividad sintética (o polimerización) y actividad nucleasa. Dicha enzima es a menudo una enzima de amplificación de un ácido nucleico. Un ejemplo de una enzima de amplificación de un ácido nucleico es una enzima polimerasa de ácido nucleico, tal como ADN-polimerasa de *Thermus aquaticus* (TaqMAN.RTM) o ADN-polimerasa I de *E. coli*. La enzima puede ser natural, no modificada o modificada.

"Polimerasa de ácido nucleico" se refiere a una enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos a un ácido nucleico. Los ejemplos de polimerasas de ácido nucleico incluyen ADN polimerasas, ARN polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas y similares.

"ADN-polimerasa termoestable" se refiere a una ADN-polimerasa que es estable (es decir, resiste a la degradación o desnaturalización) y retiene suficiente actividad catalítica cuando se somete a temperaturas elevadas durante periodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una ADN-polimerasa termoestable retiene suficiente actividad para efectuar reacciones subsiguientes de extensión del cebador, cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y se ejemplifican en las patentes de EE. UU. n.º 4.683.202 y 4.683.195. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es típicamente adecuada para su uso en una reacción de termociclación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Los ejemplos de polimerasas de ácido nucleico termoestables incluyen ADN-polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasas de *Thermotoga maritima* tales como las polimerasas TMA-25 y TMA-30, ADN-polimerasa Tth y similares.

Polimerasa "modificada" se refiere a una polimerasa en la que al menos un monómero difiere de la secuencia de referencia, tal como una forma nativa o natural de la polimerasa u otra forma modificada de la polimerasa. Las modificaciones ejemplares incluyen inserciones, deleciones y sustituciones de monómeros. Las polimerasas modificadas también incluyen polimerasas químicas que tienen secuencias de componentes identificables (por ejemplo, dominios estructurales o funcionales, etc.) derivadas de dos o más polimerasas originales. También se incluyen en la definición de polimerasas modificadas aquellas que comprenden modificaciones químicas de la secuencia de referencia. Los ejemplos de polimerasas modificadas incluyen ADN-polimerasa G46E E678G CS5, ADN-polimerasa G46E L329A E678G CS5, ADN-polimerasa G46E L329A D640G S671F CS5, ADN-polimerasa G46E L329A D640G S671F E678G CS5, una ADN-polimerasa G46E E678G CS6, ADN-polimerasa Z05, polimerasa ΔZ05, polimerasa ΔZ05-Gold, polimerasa ΔZ05R, ADN-polimerasa E615G Taq, polimerasa E678G TMA-25, polimerasa E678G TMA-30 y similares.

El término "actividad nucleasa 5' a 3'" o "actividad nucleasa 5'-3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, típicamente asociada a la síntesis de las hebras de ácido nucleico, por la que los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico, por ejemplo, la ADN-polimerasa I aislada de *E. coli* tiene esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no la tiene. Algunas enzimas que tienen actividad nucleasa en dirección 5' a 3' son exonucleasas en dirección 5' a 3'. Ejemplos de dichas exonucleasas en dirección 5' a 3' incluyen: exonucleasa de *B. subtilis*, fosfodiesterasa de bazo, exonucleasa lambda, exonucleasa II de levadura, exonucleasa V de levadura y exonucleasa de *Neurospora crassa*.

El término "fragmento predominante" se refiere a un fragmento que constituye más de un 90 % de todos los fragmentos que se pueden detectar mediante cualquier procedimiento de detección dado.

El término "propanodiol" o "espaciador de propanodiol" se refiere a 1,3-propanodiol y es sinónimo de propano-1,3-diol, 1,3-dihidroxipropano y trimetilenglicol. El término "HEG" o "espaciador de HEG" se refiere a hexaetilenglicol, que es sinónimo de 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecano-1,17-diol.

Varios aspectos de la presente invención se basan en una propiedad especial de las polimerasas de ácido nucleico. Las polimerasas de ácido nucleico pueden poseer varias actividades, entre ellas, una actividad nucleasa 5' a 3', por la que la polimerasa de ácido nucleico puede escindir mononucleótidos u oligonucleótidos pequeños de un oligonucleótido hibridado con su polinucleótido complementario más grande. Para que la escisión se produzca eficazmente, un oligonucleótido en dirección 5' también debe hibridar con el mismo polinucleótido más grande.

La detección de un ácido nucleico diana utilizando la actividad nucleasa 5' a 3' se puede realizar mediante un ensayo "TaqMan<sup>®</sup>" o "ensayo de nucleasa 5'", como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 5.210.015; 5.487.972 y 5.804.375; y en Holland *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280. En el ensayo TaqMan<sup>®</sup>, las sondas de detección marcadas que hibridan dentro de la región amplificada están presentes durante la reacción de amplificación. Las sondas se modifican para impedir que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de ADN. La amplificación se realiza usando una ADN-polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. Durante cada etapa de síntesis de la amplificación, cualquier sonda que hibrida con el ácido nucleico diana en dirección 3' desde el cebador que se extiende es degradada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN-polimerasa. Por lo tanto, la síntesis de una nueva cadena diana también da lugar a la degradación de una sonda, y la acumulación de producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de secuencias diana.

Cualquier procedimiento adecuado para detectar el producto de degradación se puede usar en un ensayo de nucleasa en dirección 5'. A menudo, la sonda de detección está marcada con dos colorantes fluorescentes, uno de los cuales es capaz de extinguir la fluorescencia del otro colorante. Los colorantes se unen a la sonda, típicamente con el colorante indicador o detector unido al extremo 5' y el colorante de extinción unido a un sitio interno, de manera que la extinción se produce cuando la sonda está en un estado no hibridado y de manera que la escisión de

la sonda por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN-polimerasa se produce entre los dos colorantes. La amplificación da lugar a la escisión de la sonda entre los colorantes con una eliminación concomitante de la extinción y un aumento de la fluorescencia observable a partir del colorante inicialmente extinguido. La acumulación del producto de degradación se monitoriza midiendo el aumento de la fluorescencia de la reacción. Las patentes de EE. UU. n.º 5.491.063 y 5.571.673 describen procedimientos alternativos para detectar la degradación de la sonda que se produce de manera concomitante con la amplificación.

Un ensayo de nucleasa en dirección 5' para la detección de un ácido nucleico diana puede emplear cualquier polimerasa que tenga una actividad exonucleasa 5' a 3'. Por tanto, en algunos modos de realización, las polimerasas con actividad nucleasa en dirección 5' son polimerasas de ácido nucleico termoestables y termoactivas. Dichas polimerasas termoestables incluyen, pero no se limitan a, formas naturales y recombinantes de polimerasas de una variedad de especies de los géneros eubacterianos *Thermus*, *Thermatoga* y *Thermosipho*, así como formas quiméricas de las mismas. Por ejemplo, polimerasas de especies *Thermus* que se pueden usar en los procedimientos de la invención incluyen ADN-polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*), ADN-polimerasa de *Thermus thermophilus* (*Tth*), ADN polimerasa de especies *Thermus* Z05 (Z05), especies *Thermus* sps17 (sps17) y especies *Thermus* Z05 (por ejemplo, descrito en las patentes de EE. UU. n.º 5.405.774, 5.352.600, 5.079.352, 4.889.818, 5.466.591, 5.618.711, 5.674.738 y 5.795.762). Las polimerasas de *Thermatoga* que se pueden usar en los procedimientos de la invención incluyen, por ejemplo, la ADN-polimerasa de *Thermatoga maritima* y la ADN-polimerasa de *Thermatoga neapolitana*, mientras que un ejemplo de una polimerasa de *Thermosipho* que se puede usar es la ADN-polimerasa de *Thermosipho africanus*. Las secuencias de las ADN-polimerasas de *Thermatoga maritima* y *Thermosipho africanus* se publican en la publicación de patente internacional n.º WO 92/06200. La secuencia de *Thermatoga neapolitana* se puede encontrar en la publicación de patente internacional n.º WO 97/09451.

En el ensayo de nucleasa en dirección 5', la detección de amplificación es típicamente concurrente con la amplificación (es decir, "en tiempo real"). En algunos modos de realización, la detección de amplificación es cuantitativa, y la detección de amplificación es en tiempo real. En algunos modos de realización, la detección de amplificación es cualitativa (por ejemplo, detección del punto final de la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana). En algunos modos de realización, la detección de amplificación es posterior a la amplificación. En algunos modos de realización, la detección de amplificación es cualitativa, y la detección de amplificación es posterior a la amplificación.

En la presente invención, la detección de los productos de degradación de la sonda oligonucleotídica no implica el uso de colorantes indicadores fluorescentes y colorantes de extinción, sino que implica la síntesis de la sonda para tener dos partes distintas. La primera parte es una parte complementaria que es al menos parcialmente complementaria de un ácido nucleico diana y está compuesta de nucleótidos estándar o análogos nucleotídicos, de manera que esta parte sea capaz de unirse al ácido nucleico diana que se desea detectar. Además, el extremo 3' de esta primera parte de la sonda está modificado o bloqueado de manera que no se pueda extender por la ADN-polimerasa. La segunda parte es una parte no complementaria que está unida al extremo 5' de la primera parte y forma una región "Flap 5'" que no es capaz de unirse al ácido nucleico diana (véase la FIG. 1). Esta parte Flap 5' puede estar constituida por nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos. Los no nucleótidos que pueden estar presentes en la segunda parte Flap 5' de la sonda oligonucleotídica pueden ser cualquier resto orgánico o unidades repetidas (por ejemplo,  $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n$ , etc.)

La primera y la segunda parte de la sonda oligonucleotídica están separadas por un conector no nucleotídico (véase la FIG. 1). Este conector puede estar compuesto por carbono, carbono y oxígeno, carbono y nitrógeno o cualquier combinación de estos y puede ser de cualquier longitud. Además, el conector puede estar compuesto por un resto lineal o un resto cíclico. El conector se puede derivar de una sola unidad o de múltiples unidades idénticas o diferentes separadas por enlaces fosfato. El objetivo del conector es crear una región bisagra desestabilizada en la unión de la primera y la segunda parte de la sonda oligonucleotídica, para obtener un fragmento predominante de nucleasa en dirección 5' por escisión en el enlace fosfodiéster que une el primer y segundo nucleótido de la primera parte de la sonda oligonucleotídica. Por lo tanto, la escisión de la sonda oligonucleotídica por una enzima con actividad nucleasa en dirección 5' da como resultado un único fragmento de "masa única" específico para la diana que consiste en la región "Flap 5'" (es decir, la segunda parte de la sonda oligonucleotídica) con el conector y un único nucleótido de la parte complementaria específica para la diana (es decir, la primera parte) de la sonda oligonucleotídica. Los ejemplos de conectores que son adecuados para uso en la presente invención incluyen propanodiol, hexaetilenglicol (HEG), trietilenglicol (TEG), Spacer Phosphoramidite 9 (Glen Research, ref. catálogo 10-1909-90), Spacer C12 CE Phosphoramidite (Glen Research, ref. catálogo 10-1928-90), and dSpacer CE Phosphoramidite (Glen Research, ref. catálogo 10-1914-90). Los conectores pueden estar en una única unidad, en múltiples unidades continuas de un único tipo de molécula o en múltiples unidades continuas de combinaciones de moléculas.

Como se indicó anteriormente, la parte Flap 5' de la sonda oligonucleotídica para un ácido nucleico diana dado puede estar compuesta por nucleótidos, no nucleótidos o una combinación de ambos, siempre que tenga un tamaño de masa único que la distinga y que se puede resolver de los Flaps 5' de los otros ácidos nucleicos diana. En principio, esto puede permitir la detección múltiple de cientos de ácidos nucleicos diana de una única reacción. Por

ejemplo, usando solo los nucleótidos estándar A, G, C y T, un Flap 5' que consta de solo 6 nucleótidos puede producir 84 fragmentos posibles, todos los cuales tienen tamaños únicos distinguibles en masa. Además, la parte de Flap 5' se puede unir con marcadores modificadores para facilitar la separación o purificación de fragmentos, tales como marcadores fluorados en cromatografía de separación de fases (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.859.247) o marcadores de biotina en cromatografía de afinidad con biotina-estreptavidina.

La presente invención proporciona cebadores oligonucleotídicos y sondas oligonucleotídicas. No se pretende que los procedimientos utilizados para producir estas sondas y cebadores estén de ninguna manera limitados. Un experto en la técnica está muy familiarizado con la amplia variedad de estrategias y reactivos de síntesis química para producir sondas y cebadores. Tampoco se pretende que las sondas oligonucleotídicas de la invención se limiten a estructuras de nucleótidos naturales o a bases naturales (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo). Además de las bases heterocíclicas naturales que se encuentran típicamente en los ácidos nucleicos, los análogos de ácidos nucleicos no naturales también encuentran uso con la invención.

Los análogos no naturales incluyen aquellos que tienen bases heterocíclicas no naturales u otras bases modificadas. En particular, muchas bases no naturales se describen además, por ejemplo, en Seela *et al.* (1991), *Helv. Chim. Acta* 74: 1790, Grein *et al.* (1994), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 971-976 y Seela *et al.* (1999), *Helv. Chim. Acta* 82: 1640. A título ilustrativo adicional, se incluyen opcionalmente ciertas bases usadas en nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (Tm). Por ejemplo, algunas de estas incluyen 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.990.303. Otras bases heterocíclicas representativas incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; 8-aza-derivados de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 7-desaza-8-aza-derivados de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 7-desazaadenina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 7-desazaguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-etiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinil-pirimidina y similares. A título ilustrativo adicional, otros ejemplos de oligonucleótidos modificados incluyen aquellos que tienen uno o más monómeros de ácido nucleico bloqueado (LNA™) (oligonucleótidos que comprenden monómeros LNA™ disponibles de, por ejemplo, Link Technologies, Ltd., Lanarkshire, Scotland; bajo licencia de Exiqon A/S, Vedbæk, Dinamarca). Análogos de nucleótidos como estos también se describen en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.639.059; la patente de EE. UU. n.º 6.303.315; y la publicación de patente de EE. UU. n.º 2003/0092905.

Las sondas y cebadores oligonucleotídicos se pueden preparar usando cualquier técnica conocida en la técnica. En ciertos modos de realización, por ejemplo, las sondas y cebadores oligonucleotídicos se sintetizan químicamente usando cualquier procedimiento de síntesis de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers (1981), *Tetrahedron Letts.* 22(20): 1859-1862. A título ilustrativo adicional, los oligonucleótidos también se pueden sintetizar usando un procedimiento de triéster (véase, por ejemplo, Capaldi *et al.* (2000), "Highly efficient solid phase synthesis of oligonucleotide analogs containing phosphorodithioate linkages", *Nucleic Acids Res.* 28(9):e40, y Eldrup *et al.* (1994), "Preparation of oligodeoxyribonucleoside phosphorodithioates by a triester method", *Nucleic Acids Res.* 22(10): 1797-1804). También se pueden utilizar otras técnicas de síntesis conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el uso de un sintetizador automatizado, como se describe en Needham VanDevanter *et al.* (1984), *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168. Una amplia variedad de equipos están comercialmente disponibles para la síntesis automatizada de oligonucleótidos. También se utilizan opcionalmente estrategias de síntesis de múltiples nucleótidos (por ejemplo, síntesis de tri-nucleótidos, etc.). Además, los ácidos nucleicos cebadores incluyen opcionalmente diversas modificaciones. En ciertos modos de realización, por ejemplo, los cebadores incluyen conectores de sitios de restricción, por ejemplo, para facilitar la posterior clonación de amplicones o similares. A título ilustrativo adicional, los cebadores también se modifican opcionalmente para mejorar la especificidad de las reacciones de amplificación como se describe en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.001.611, y las sondas también se pueden sintetizar con varias otras modificaciones como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica.

Las sondas utilizadas en las mezclas de reacción, procedimientos y otros aspectos de la invención pueden tener marcadores nucleotídicos o no nucleotídicos. Dichos marcadores se pueden unir a oligonucleótidos directa o indirectamente mediante una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. A título ilustrativo, dependiendo del tipo de marcador usado, el marcador puede estar unido a un nucleótido terminal (extremo 5' o 3' de un cebador y/o sonda oligonucleotídica) o a un nucleótido no terminal, y puede estar unido indirectamente a través de conectores o brazos espaciadores de varios tamaños y composiciones. Usando reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente, se pueden producir oligonucleótidos que contienen grupos funcionales (por ejemplo, tioles o aminas

primarias) en el extremo 5' o 3' a través de una fosforamidita apropiadamente protegida, y se pueden unir marcadores a dichos oligonucleótidos usando protocolos descritos, por ejemplo, en Innis *et al.* (Eds.) "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Elsevier Science & Technology Books (1990) (Innis).

5 Esencialmente cualquier ácido nucleico (estándar o no estándar, marcado o no marcado) se puede personalizar o adquirir de forma estándar de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company (Midland, TX), Operon Technologies Inc. (Huntsville, AL), Prologo LLC (Boulder, CO) y muchas otras.

10 Existen muchos desafíos en el uso de la espectrometría de masas para la detección de productos de PCR, particularmente en una configuración múltiplex para detectar una gran cantidad de ácidos nucleicos diana. Beer *et al.* (Analyst, 2012, 137: 5325-5333) describieron un ensayo de genotipificación de PCR múltiplex usando cromatografía líquida-espectrometría de masas con ionización por electrospray para la detección de 23 SNP distintos de catorce genes. Las longitudes de los amplicones de estos sitios de SNP oscilaron entre 78 pb y 130 pb.  
15 Sin embargo, se sabe que los amplicones largos no se ionizan bien y son difíciles de separar por espectrometría de masas. Además, los productos de PCR bicatenarios pueden complicar el análisis debido a la pequeña diferencia de masa entre los pares de bases A:T y G:C. Por lo tanto, el uso de fragmentos diana cortos y únicos generados durante la PCR sería más fácil de detectar, daría lugar a una mayor sensibilidad y proporcionaría una mayor probabilidad de éxito para la multiplexación.

20 Varios estudios recientes han divulgado el uso de sondas oligonucleotídicas que contienen una parte de "marcador" escindible que se puede separar y detectar fácilmente (por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0053939, patente de EE. UU. n.º 8.133.701). Sin embargo, estos estudios tienen una capacidad limitada para realizar la detección múltiplex de ácido nucleico diana debido a la naturaleza compleja de la molécula de "marcador"  
25 en el caso de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0053939 o la generación de fragmentos múltiples para un determinado ácido nucleico diana en el caso de la patente de EE. UU. n.º 8.133.701. En cualquier caso, sería difícil realizar una identificación precisa de la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana particular en una configuración múltiplex. Este problema se resuelve con la presente invención, en la que la parte de Flap 5' y la parte complementaria de la sonda oligonucleotídica se separan mediante un conector en el que, después de la escisión por una enzima con actividad nucleasa en dirección 5', se generaría un único fragmento de "masa única" que consistiría en la región Flap 5', el conector y un nucleótido adicional en el extremo 5' de la parte complementaria para cada ácido nucleico diana individual que luego se puede detectar y resolver de forma inequívoca mediante espectrometría de masas.

35 Los fragmentos con tamaños de masa distinguible (MDF) se distinguen por un atributo físico o característica de detección particular, incluyendo pero no limitado a longitud, masa, carga o relación carga-masa. En un modo de realización preferente, la característica de detección es la masa. En otro modo de realización relacionado, el MDF se puede distinguir por un comportamiento que está relacionado con un atributo físico, incluyendo pero no limitado a masa, tiempo de vuelo en espectrometría de masas MALDI-TOF. En un modo de realización relacionado, los MDF  
40 de una o más sondas oligonucleotídicas se liberan y se desorben selectivamente a partir de una matriz espectral de masa de manera que los cebadores y las sondas oligonucleotídicas no selectivos (es decir, el ácido nucleico diana no está presente) no se desorben. Para estos modos de realización, los MDF se deben desorber más eficientemente de la matriz espectral de masa que las sondas oligonucleotídicas u otros no MDF presentes en la mezcla de reacción. Las matrices espectrales de masa preferentes incluyen ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), citrato de diamonio (DAC) y combinaciones de los mismos. En otro modo de realización, las matrices espectrales de masa se pueden diseñar para el análisis de proteínas. Ejemplos de matrices para el análisis de proteínas incluyen, pero no se limitan a, DHB y CHCA.

50 El procedimiento puede incluir además una etapa adicional de separación de uno o más fragmentos de la sonda oligonucleotídica (es decir, MDF) de sondas oligonucleotídicas no escindidas o parcialmente escindidas. La separación se puede llevar a cabo usando ligandos de captura, tales como biotina u otros ligandos de afinidad, y agentes de captura, tales como avidina, estreptavidina, un anticuerpo, un receptor, una sonda de captura que es complementaria del MDF o un fragmento funcional del mismo, que tenga actividad de unión específica al ligando de captura. Un MDF puede contener un ligando de captura que tenga actividad de unión específica a un agente de  
55 captura. También se puede usar un ligando de captura y un agente de captura para añadir masa a la parte restante del MDF de manera que se pueda excluir del intervalo de masas del MDF detectado en un espectrómetro de masas. En un modo de realización, la sonda de captura puede tener un cebador universal para la amplificación universal del producto de escisión.

60 También se puede usar una etapa de separación para eliminar sales, enzimas u otros componentes tampón de los MDF. Se pueden usar varios procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como cromatografía, electroforesis en gel o precipitación, para limpiar la muestra. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de afinidad para eliminar la sal de una muestra. La elección del procedimiento de separación puede depender de la cantidad de una muestra. Por ejemplo, cuando se dispone de pequeñas cantidades de muestra o se  
65 utiliza un aparato miniaturizado, se puede usar una etapa de separación por cromatografía de microafinidad. Además, si se desea una etapa de separación, la elección del procedimiento de separación puede depender del

procedimiento de detección utilizado. Por ejemplo, la eficiencia de la desorción/ionización por láser asistida por matriz y la ionización por electrospray se puede mejorar eliminando las sales de una muestra. Por ejemplo, las sales pueden absorber energía del láser en la desorción/ionización por láser asistida por matriz y dar lugar a una menor eficiencia de ionización.

5 La espectrometría de masas es el procedimiento preferente para detectar fragmentos con tamaños de masa distinguible (MDF) de la invención y, por tanto, identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana. Los MDF se pueden ionizar en un espectrómetro de masas y los iones se pueden separar en el espacio o en el tiempo basándose en su relación masa-carga. El espectrómetro de masas calcula entonces una masa asociada a cada ion. Por lo tanto, cuando se hace referencia a la espectrometría de masas, el término masa se puede usar como simplificación para describir una relación masa-carga.

15 La espectrometría de masas es una técnica sensible y precisa para separar e identificar moléculas. En general, los espectrómetros de masas tienen dos componentes principales, una fuente de iones para la producción de iones y un analizador selectivo de masas para medir la relación masa-carga de los iones, que es y se convierte en una medida de masa para dichos iones. Diversos procedimientos de ionización son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Un MDF se puede cargar antes, durante o después de la escisión de la sonda oligonucleotídica. En consecuencia, un MDF que se medirá por espectrometría de masas no siempre requiere una carga, ya que puede adquirir una carga durante el procedimiento de espectrometría de masas. En el análisis por espectrometría de masas se pueden usar componentes opcionales de un MDF, tales como restos de carga y detección, para aportar masa al MDF.

25 Diferentes procedimientos de espectrometría de masas, por ejemplo, espectrometría de masas cuadrupolar, espectrometría de masas por trampa de iones, espectrometría de masas de tiempo de vuelo, espectrometría de masas con cromatografía de gases y espectrometría de masas en tándem, tal como se describe en el presente documento, pueden utilizar diversas combinaciones de fuentes de iones y analizadores de masas que aportan flexibilidad al diseño de protocolos de detección personalizados. Además, los espectrómetros de masas se pueden programar para transmitir todos los iones de la fuente de iones al espectrómetro de masas de forma secuencial o al mismo tiempo. Además, un espectrómetro de masas se puede programar para seleccionar iones de una masa particular para su transmisión al espectrómetro de masas mientras bloquea otros iones.

35 La capacidad para controlar con precisión el movimiento de iones en un espectrómetro de masas aporta mayores opciones a los protocolos de detección que pueden ser ventajosas cuando se analiza un gran número de mMDF, por ejemplo, a partir de un experimento múltiplex. Por ejemplo, en un experimento múltiplex con un gran número de MDF, puede ser ventajoso seleccionar indicadores individuales de un grupo de indicadores similares y luego analizar ese indicador por separado. Otra ventaja basada en el control del intervalo de masas detectado por el espectrómetro de masas incluye la capacidad de excluir del análisis sondas marcadas no escindidas o parcialmente escindidas, lo que reduce el ruido de fondo del ensayo.

40 Los espectrómetros de masas pueden resolver iones con pequeñas diferencias de masa y medir la masa de iones con un alto grado de precisión. Por lo tanto, los MDF de masas similares se pueden usar juntos en el mismo experimento, ya que el espectrómetro de masas puede diferenciar la masa de marcadores incluso estrechamente relacionados. El alto grado de resolución y precisión de masa logrado usando procedimientos de espectrometría de masas permite el uso de grandes conjuntos de sondas marcadas, ya que los marcadores indicadores resultantes se pueden distinguir entre sí. La capacidad para utilizar grandes conjuntos de sondas marcadas es una ventaja en el diseño de experimentos múltiplex.

50 Otra ventaja de utilizar la espectrometría de masas para detectar la masa de un MDF se basa en la alta sensibilidad de este tipo de análisis de masas. Los espectrómetros de masas alcanzan una alta sensibilidad mediante el uso de una gran parte de los iones que se forman en la fuente de iones y la transmisión eficiente de dichos iones a través del analizador de masas y hasta el detector. Este alto nivel de sensibilidad permite el uso de la espectrometría de masas incluso para medir cantidades limitadas de muestra. Esto puede ser una ventaja en un experimento múltiplex donde la cantidad de cada especie MDF puede ser pequeña.

55 Los métodos de espectrometría de masas son bien conocidos en la técnica (véase Burlingame *et al.*, Anal. Chem. 70: 647R-716R (1998); Kinter y Sherman, "Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry", Wiley-Interscience, Nueva York (2000)). Los procedimientos básicos asociados a un procedimiento de espectrometría de masas son la generación de iones en fase gaseosa derivados de la muestra y la medición de su masa.

60 El movimiento de iones en fase gaseosa se puede controlar con precisión usando campos electromagnéticos generados en el espectrómetro de masas. El movimiento de iones en estos campos electromagnéticos es proporcional a la  $m/z$  (relación masa-carga) del ion y esto constituye la base para medir la  $m/z$  y, por lo tanto, la masa de una muestra. El movimiento de iones en estos campos electromagnéticos permite la contención y focalización de los iones, lo que explica la alta sensibilidad de la espectrometría de masas. Durante el transcurso de la medición de la  $m/z$ , los iones se transmiten con alta eficiencia a los detectores de partículas que registran la

65

llegada de dichos iones. La cantidad de iones en cada  $m/z$  se demuestra mediante picos en un gráfico donde el eje de abscisas es  $m/z$  y el eje de ordenadas es la abundancia relativa. Diferentes espectrómetros de masas tienen diferentes niveles de resolución, es decir, la capacidad para resolver picos entre iones estrechamente relacionados en cuanto a masa. La resolución se define como  $R = m/\Delta m$ , donde  $m$  es la masa de iones y  $\Delta m$  es la diferencia de masa entre dos picos de un espectro de masas. Por ejemplo, un espectrómetro de masas con una resolución de 1000 puede resolver un ion con una  $m/z$  de 100,0 de un ion con una  $m/z$  de 100,1.

Varios tipos de espectrómetros de masas están disponibles o se pueden producir con varias configuraciones. En general, un espectrómetro de masas tiene los siguientes componentes principales: una entrada de muestra, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío y un sistema de control de instrumentos y un sistema de datos. Las diferencias en la entrada de la muestra, la fuente de iones y el analizador de masas definen en general el tipo de instrumento y sus capacidades. Por ejemplo, una entrada puede ser una fuente de cromatografía líquida en columna capilar o puede ser una sonda directa o fase tal como se utiliza en la desorción por láser asistida por matriz. Fuentes de iones comunes son, por ejemplo, electrospray, incluyendo nanospray y microspray o desorción por láser asistida por matriz. Ejemplos de analizadores de masas incluyen un filtro de masa cuadrupolar, un analizador de masas con trampa de iones y un analizador de masas de tiempo de vuelo.

El procedimiento de formación de iones es un punto de partida para el análisis del espectro de masas. Existen varios procedimientos de ionización disponibles y la elección del procedimiento de ionización depende de la muestra que se va a analizar. Por ejemplo, para el análisis de polipéptidos puede ser deseable un procedimiento de ionización relativamente suave tal como la ionización por electrospray (ESI). Para la ESI, una solución que contiene la muestra se pasa a través de una aguja fina con un elevado potencial que crea un fuerte campo eléctrico que da lugar a una pulverización fina de gotitas altamente cargadas que se dirige al espectrómetro de masas. Otros procedimientos de ionización incluyen, por ejemplo, el bombardeo de átomos rápidos (FAB) que utiliza un haz de átomos neutros de alta energía para golpear una muestra sólida, causando desorción e ionización. La ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI) es un procedimiento en el que se utiliza un pulso de láser para golpear una muestra que ha sido cristalizada en una matriz de compuesto absorbente de UV. Otros procedimientos de ionización conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, plasma de descarga luminiscente, ionización por desorción de plasma, ionización por resonancia e ionización secundaria. Un MDF se puede ionizar antes, durante o después de la escisión de la sonda marcada.

La ionización por electrospray (ESI) tiene varias propiedades que son útiles para la invención descrita en el presente documento. Por ejemplo, la ESI se puede usar para moléculas biológicas tales como polipéptidos que son difíciles de ionizar o evaporar. Además, la eficiencia de la ESI puede ser muy alta, lo que proporciona la base para mediciones altamente sensibles. Además, la ESI produce moléculas cargadas a partir de una disolución, lo cual es práctico para analizar MDF que están en disolución. Por el contrario, procedimientos de ionización tales como MALDI requieren la cristalización de la muestra antes de la ionización.

Dado que la ESI puede producir moléculas cargadas directamente de una disolución, es compatible con muestras de sistemas de cromatografía líquida. Por ejemplo, un espectrómetro de masas puede tener una entrada para un sistema de cromatografía líquida, tal como una HPLC, de modo que las fracciones fluyan desde la columna de cromatografía hasta el espectrómetro de masas. Esta disposición en línea de un sistema de cromatografía líquida y un espectrómetro de masas se denomina a veces CLEM. Un sistema CLEM se puede usar, por ejemplo, para separar los MDF no escindidos o parcialmente escindidos de los MDF escindidos antes del análisis por espectrometría de masas. Además, la cromatografía se puede usar para eliminar sales u otros componentes tampón de la muestra de MDF antes del análisis por espectrometría de masas. Por ejemplo, el desalado de una muestra usando una columna de HPLC en fase inversa, en línea o fuera de línea, se puede usar para aumentar la eficiencia del procedimiento de ionización y mejorar de este modo la sensibilidad de detección por espectrometría de masas.

Hay disponibles una variedad de analizadores de masas que se pueden emparejar con diferentes fuentes de iones. Diferentes analizadores de masas tienen diferentes ventajas, conocidas por los expertos en la técnica y como se describen en el presente documento. El espectrómetro de masas y los procedimientos elegidos para la detección dependen del ensayo particular, por ejemplo, se puede usar un analizador de masas más sensible cuando se genera una pequeña cantidad de iones para la detección. A continuación se describen varios tipos de analizadores de masas y procedimientos de espectrometría de masas.

La espectrometría de masa por movilidad iónica (MI) es un procedimiento de separación en fase gaseosa que añade nuevas dimensiones a la espectrometría de masas (EM). La MI separa iones en fase gaseosa basándose en su sección transversal de colisión y se puede acoplar a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF) para producir una potente herramienta utilizada en la identificación y caracterización de proteínas y péptidos. Por lo tanto, la EM-MI tiene una utilidad particular para la presente invención cuando el MDF es una proteína o péptido. La EM-MI se analiza con más detalle por Verbeck *et al.* en Journal of Biomolecular Techniques (vol. 13, número 2, 56-61).

La espectrometría de masas cuadrupolar utiliza un filtro o analizador de masas cuadrupolar. Este tipo de analizador de masas se compone de cuatro barras dispuestas como dos juegos de dos barras conectadas eléctricamente. A cada par de barras se aplica una combinación de tensiones de RF y CC que produce campos que provocan un

movimiento oscilante de los iones cuando se mueven desde el comienzo del filtro de masas hasta el extremo. El resultado de estos campos es la producción de un filtro de masa de paso alto en un par de barras y un filtro de paso bajo en el otro par de barras. La superposición entre el filtro de paso alto y el filtro de paso bajo deja una  $m/z$  definida que puede pasar ambos filtros y recorrer la longitud del cuadrupolo. Esta  $m/z$  se selecciona y permanece estable en el filtro de masas cuadrupolar mientras que todas las demás  $m/z$  tienen trayectorias inestables y no permanecen en el filtro de masas. Un espectro de masas resulta por el aumento de los campos aplicados de manera que se selecciona una  $m/z$  creciente para pasar a través del filtro de masas y alcanzar el detector. Además, también se pueden configurar cuadrupolos para contener y transmitir iones de todas las  $m/z$  aplicando un campo de RF únicamente. Esto permite que los cuadrupolos funcionen como una lente o sistema de enfoque en regiones del espectrómetro de masas donde la transmisión de iones es necesaria sin filtrado de masas. Esto será útil en espectrometría de masas en tándem, como se describe más adelante.

Un analizador de masas cuadrupolar, así como los otros analizadores de masas descritos en el presente documento, se pueden programar para analizar una  $m/z$  definida o un intervalo de masas. Esta propiedad de los espectrómetros de masas es útil para la invención descrita en el presente documento. Dado que el intervalo de masas de MDF escindidos se conocerá antes de un ensayo, se puede programar un espectrómetro de masas para transmitir iones del intervalo de masas correcto previsto, mientras se excluyen los iones de un intervalo de masas mayor o menor. La capacidad para seleccionar un intervalo de masas puede disminuir el ruido de fondo en el ensayo y, por lo tanto, aumentar la relación señal-ruido. Además, se puede utilizar un intervalo de masas definido para excluir el análisis de cualquier sonda oligonucleotídica no escindida, que tendría mayor masa que la masa de los MDF. Por lo tanto, el espectrómetro de masas puede llevar a cabo una etapa de separación inherente, así como la detección e identificación de los MDF.

La espectrometría de masas por trampa de iones utiliza un analizador de masas de trampa de iones. En estos analizadores de masas se aplican campos de modo que los iones de todas las  $m/z$  queden inicialmente atrapados y oscilen en el analizador de masas. Los iones entran en la trampa de iones desde la fuente de iones a través de un dispositivo de enfoque, tal como un sistema de lente octapolar. El atrapamiento de iones tiene lugar en la zona de atrapamiento antes de la excitación y la expulsión a través de un electrodo hasta el detector. El análisis de masas se logra aplicando secuencialmente tensiones que aumentan la amplitud de las oscilaciones de una manera que expulsa los iones de  $m/z$  creciente fuera de la trampa y en el detector. En contraste con la espectrometría de masas cuadrupolar, todos los iones se mantienen en los campos del analizador de masas excepto aquellos con la  $m/z$  seleccionada. Una de las ventajas de las trampas de iones es que tienen una sensibilidad muy alta, siempre y cuando se tenga cuidado de limitar el número de iones que se atrapan al mismo tiempo. El control del número de iones se puede lograr variando el tiempo durante el cual los iones se inyectan en la trampa. La resolución de masas de las trampas de iones es similar a la de los filtros de masas cuadrupolares, aunque las trampas de iones tienen limitaciones en  $m/z$  bajas.

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo utiliza un analizador de masas de tiempo de vuelo. Para este procedimiento de análisis de  $m/z$ , un ion recibe en primer lugar una cantidad fija de energía cinética por aceleración en un campo eléctrico (generado por alta tensión). Después de la aceleración, el ion entra en una región libre de campo o "deriva", donde viaja a una velocidad que es inversamente proporcional a su  $m/z$ . Por lo tanto, los iones con baja  $m/z$  viajan más rápidamente que los iones con  $m/z$  alta. El tiempo requerido para que los iones recorran la longitud de la región libre de campo se mide y se usa para calcular la  $m/z$  del ion.

Una consideración en este tipo de análisis de masas es que el conjunto de iones que se estudian se introduce al mismo tiempo en el analizador. Por ejemplo, este tipo de análisis de masas es muy adecuado para técnicas de ionización como MALDI que producen iones en pulsos bien definidos y cortos. Otra consideración es controlar la propagación de la velocidad producida por iones que tienen variaciones en sus cantidades de energía cinética. El uso de tubos de vuelo más largos, reflectores de iones o tensiones de aceleración más altas puede ayudar a minimizar los efectos de la propagación de la velocidad. Los analizadores de masas de tiempo de vuelo tienen un alto nivel de sensibilidad y un intervalo de  $m/z$  más amplio que los analizadores de masas cuadrupolares o de trampa de iones. Este tipo de analizador de masas también permite adquirir datos rápidamente, ya que no es necesaria una exploración del analizador de masas.

La espectrometría de masas con cromatografía de gases ofrece una buena solución para detectar una diana en tiempo real. La parte de cromatografía de gases (CG) del sistema separa la mezcla química en impulsos de analito (por ejemplo, MDF) y el espectrómetro de masas (EM) identifica y cuantifica el analito.

La espectrometría de masas en tándem puede utilizar combinaciones de los analizadores de masas descritos anteriormente. Los espectrómetros de masas en tándem pueden utilizar un primer analizador de masas para separar los iones de acuerdo con su  $m/z$  para aislar un ion de interés para su análisis posterior. El ion de interés aislado se rompe a continuación en iones de fragmentos (denominados disociación activada por colisión o disociación inducida por colisión) y los iones de fragmentos son analizados por el segundo analizador de masas. Estos tipos de sistemas de espectrómetros de masas en tándem se llaman sistemas de tándem en espacio porque los dos analizadores de masas están separados en el espacio, en general por una celda de colisión. Los sistemas de espectrómetros de masas en tándem también incluyen sistemas de tándem en tiempo en los que se utiliza un analizador de masas; sin

embargo, el analizador de masas se usa secuencialmente para aislar un ion, inducir la fragmentación y luego realizar un análisis de masas.

Los espectrómetros de masas de la categoría *tándem en espacio* tienen más de un analizador de masas. Por ejemplo, un sistema de espectrometría de masas cuadrupolar en *tándem* puede tener un primer filtro de masas cuadrupolar, seguido por una celda de colisión, seguido por un segundo filtro de masas cuadrupolar y luego por el detector. Otra disposición consiste en utilizar un filtro de masas cuadrupolar para el primer analizador de masas y un analizador de masas de tiempo de vuelo para el segundo analizador de masas con una celda de colisión que separa los dos analizadores de masas. Otros sistemas en *tándem* son conocidos en la técnica, incluyendo espectrometría de masas con reflectrón de tiempo de vuelo, con sector *tándem* y sector cuadrupolo.

Los espectrómetros de masas de la categoría *tándem en tiempo* tienen un analizador de masas que realiza diferentes funciones en diferentes momentos. Por ejemplo, se puede usar un espectrómetro de masas con trampa de iones para atrapar iones de todas las *m/z*. Se aplican una serie de funciones de exploración por RF que expulsan iones de todas las *m/z* de la trampa excepto las *m/z* de los iones de interés. Después de que se haya aislado la *m/z* de interés, se aplica un pulso de RF para producir colisiones con moléculas de gas en la trampa para inducir la fragmentación de los iones. A continuación, los valores de *m/z* de los iones fragmentados se miden mediante el analizador de masas. Los instrumentos de resonancia de ciclotrón de iones, también conocidos como espectrómetros de masas con transformada de Fourier, son un ejemplo de sistemas de *tándem en tiempo*.

Se pueden realizar varios tipos de experimentos de espectrometría de masas en *tándem* controlando los iones que se seleccionan en cada etapa del experimento. Los diferentes tipos de experimentos utilizan diferentes modos de funcionamiento, a veces llamados "exploraciones", de los analizadores de masas. En un primer ejemplo, denominado exploración de espectro de masas, el primer analizador de masas y la celda de colisión transmiten todos los iones para el análisis de masas al segundo analizador de masas. En un segundo ejemplo, denominado exploración de iones de producto, los iones de interés se seleccionan según su masa en el primer analizador de masas y después se fragmentan en la celda de colisión. Los iones formados se analizan entonces por su masa explorando el segundo analizador de masas. En un tercer ejemplo, denominado exploración de iones precursores, se explora el primer analizador de masas para transmitir secuencialmente los iones analizados según su masa a la celda de colisión para su fragmentación. El segundo analizador de masas selecciona por su masa el ion de producto de interés para la transmisión al detector. Por lo tanto, la señal del detector es el resultado de todos los iones precursores que se pueden fragmentar en un ion de producto común. Otros formatos experimentales incluyen exploraciones de pérdida neutra donde las exploraciones de masa tienen en cuenta una diferencia de masa constante. El uso de estos diferentes procedimientos de exploración por espectrometría de masas en *tándem* puede ser ventajoso cuando se miden grandes conjuntos de marcadores indicadores en un solo experimento, como con experimentos múltiplex.

En aplicaciones típicas, la cantidad de MDF generada durante la reacción se determina basándose en el valor de umbral de ciclo (*Ct*), que representa el número de ciclos requeridos para generar una cantidad detectable de ácido nucleico. La determinación de los valores de *Ct* es bien conocida en la técnica. Brevemente, durante la PCR, a medida que aumenta la cantidad de amplicón formado, la intensidad de la señal aumenta hasta un nivel mensurable y alcanza una meseta en ciclos posteriores cuando la reacción entra en una fase no logarítmica. Mediante el trazado de la intensidad de la señal frente al número de ciclos durante la fase logarítmica de la reacción, se puede deducir y utilizar el ciclo específico en el que se obtiene una señal mensurable para calcular la cantidad de la diana antes del inicio de la PCR. Los métodos ejemplares para determinar *Ct* se describen, por ejemplo, en Heid *et al.*, *Genome Methods* 6:986-94, 1996, con referencia a las sondas de hidrólisis.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

*Detección de la amplificación de EGFR T790M usando una sonda Flap 5'*

Se realizó un ensayo de PCR para detectar la mutación T790M (cambio de nucleótido 2369 C->T) del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (*EGFR*). Se usaron los siguientes cebadores para la amplificación de una región del gen *EGFR* que incluye la posición de la mutación T790M:

Cebador directo: 5' CCTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGA 3' (SEQ ID NO: 1)

Cebador inverso: 5' CAGTCGAAGGGCATGAGCTGEA 3' (E = *t*-butil-bencil-dC) (SEQ ID NO: 2)

Para la detección se utilizó la siguiente sonda Flap 5' que contiene dos moléculas continuas de hexaetilenglicol (HEG) como conector:

5' -T<sub>9</sub>JJTGCACGGTGGAGGTGAGGCAGP-3' (SEQ ID NO: 3), en la que T<sub>9</sub> representa la parte de Flap

## ES 2 691 344 T3

- 5' no complementaria, J representa HEG y P representa fosfato. Las mezclas de reacción de PCR se prepararon en una placa de 96 pocillos con las siguientes concentraciones finales: 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 80-100 mM de cloruro de potasio, 200  $\mu$ M cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 400  $\mu$ M de dUTP, 200 nM de cada cebador, 200 nM de sonda Flap 5', ADN diana (1000-100 000 copias de plásmido de EGFR, 20 nM de ADN polimerasa (con actividad nucleasa en dirección 5'), 0,1 mM de EDTA, 2,5 mM de acetato de magnesio. La amplificación y el análisis se realizaron utilizando el instrumento Roche LightCycler® 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind.). Se usó el siguiente perfil de temperatura: 95 °C durante 1 minuto (o 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 62 °C (25 segundos), seguido de 99 ciclos de 92 °C (10 segundos) a 62 °C (25-30 segundos).
- 10 Los productos de reacción se pasaron a través de columnas de centrifugación de intercambio aniónico TopTip (Glygen Corp.) para la eliminación del detergente y otros contaminantes, y luego se cargaron en el instrumento Agilent Q-TOF 6530 y los fragmentos se analizaron por CLEM. La FIG. 2 muestra el cromatograma de iones extraídos (EIC) de este experimento para buscar fragmentos correspondientes en tamaño a T<sub>9</sub>JJT y T<sub>9</sub>JJTG. Solo se detectó un único pico correspondiente al fragmento T<sub>9</sub>JJT, lo que demuestra la escisión por la enzima nucleasa en dirección 5' casi exclusivamente en la posición de nucleótidos que es adyacente en dirección 3' a los dobles moléculas conectoras HEG. El nucleótido "T" en el extremo 3' de este fragmento correspondía al nucleótido del extremo 5' de la parte de la sonda que es complementaria al gen *EGFR*.
- 15

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Molecular Systems, Inc.	
	<120> IDENTIFICACIÓN MULTIPLEXADA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA	
10	<130> 31896-WO-HS	
	<150> US 61/918.896	
	<151> 20/12/2013	
15	<160> 3	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo	
	<400> 1	
	<b>cctccctcca ggaagcctac gtga</b>	<b>24</b>
30	<210> 2	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador inverso	
40	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (21) . . (21)	
	<223> t-butyl-bencil-dC	
	<400> 2	
	<b>cagtcgaagg gcatgagctg ca</b>	<b>22</b>
45	<210> 3	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda Flap 5'	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9) . . (10)	
	<223> 2 x conector HEG	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (30) . . (30)	
	<223> fosfato 3'	
65	<400> 3	
	<b>ttttttttttt gcacggtgga ggtgaggcag</b>	<b>30</b>

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende las etapas de:
- 5
- (a) poner en contacto una muestra que comprende un ácido nucleico diana con:
- (i) un par de cebadores oligonucleotídicos, en el que un primer cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en una cadena de la secuencia de ácido nucleico diana y ceba la síntesis de un primer producto de extensión, y en el que un segundo cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en el primer producto de extensión y ceba la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria del primer producto de extensión, y
- 10
- (ii) una sonda oligonucleotídica que comprende al menos dos partes distintas, una primera parte que comprende nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria de una región de la secuencia del ácido nucleico diana en la que la primera parte se asocia a la secuencia del ácido nucleico diana unida por el par de cebadores de oligonucleotídicos, y en la que la primera parte está bloqueada en el extremo 3' para prohibir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico; y una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte que comprende nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana; en la que la segunda parte está separada de la primera parte mediante un conector no nucleotídico derivado de una única unidad o de múltiples unidades separadas por enlaces fosfato, en la que el conector crea una región desestabilizada en la unión de la primera parte y la segunda parte;
- 15
- (b) amplificar la secuencia de ácido nucleico diana con una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3' en condiciones que permiten la hibridación del par de cebadores oligonucleotídicos y la sonda oligonucleotídica con la secuencia de ácido nucleico diana y la síntesis de productos de extensión del cebador a partir del par de cebadores oligonucleotídicos mientras que la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de la polimerasa de ácido nucleico es capaz de escindirse y liberarse de la sonda oligonucleotídica hibridada, comprendiendo un fragmento predominante la segunda parte de la sonda oligonucleotídica, el conector no nucleotídico y un único nucleótido en el extremo 5' de la primera parte de la sonda oligonucleotídica; y
- 20
- (c) detectar la presencia o ausencia del fragmento predominante por espectrometría de masas, detectando de este modo la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra.
- 25
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se detectan dos o más ácidos nucleicos diana en una única reacción multiplexada.
- 30
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dos o más sondas oligonucleotídicas se usan para detectar los dos o más ácidos nucleicos diana en la única reacción multiplexada.
- 35
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el conector no nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en propanodiol, hexaetilenglicol (HEG), trietilenglicol (TEG), Spacer Phosphoramidite 9, Spacer C12 CE Phosphoramidite y dSpacer CE Phosphoramidite, o combinaciones de los mismos.
- 40
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el conector no nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en propanodiol y HEG.
- 45
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la detección se realiza mediante un espectrómetro de masas, seleccionado del grupo que consiste en desorción/ionización por láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), EM, EM en tándem, ionización por electrospray y analizador de tiempo de vuelo (ESI-TOF), ESI-iontrap, cromatografía líquida (CL)-EM, cromatografía de gases (CG)-EM y EM por movilidad iónica (MI).
- 50
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la polimerasa de ácido nucleico es una ADN-polimerasa termoestable.
- 55
8. Una composición para detectar la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra que comprende una sonda oligonucleotídica en la que la sonda oligonucleotídica comprende al menos dos partes distintas, en la que una primera parte comprende nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria de una región de la secuencia del ácido nucleico diana que se desea detectar de modo que la primera parte es capaz de unirse a la región de la secuencia del ácido nucleico diana y en la que dicha primera parte está bloqueada en el
- 60
- 65

extremo 3' para prohibir la extensión de la sonda oligonucleotídica por una ADN-polimerasa; y una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte que comprende nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia del ácido nucleico diana que se desea detectar; en la que la primera parte y la segunda parte se separan mediante un conector no nucleotídico derivado de una única unidad o de múltiples unidades separadas por enlaces fosfato, en la que el conector crea una región desestabilizada en la unión de la primera parte y la segunda parte de la sonda oligonucleotídica.

- 5
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el conector no nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en propanodiol, hexaetilenglicol (HEG), trietilenglicol (TEG), Spacer Phosphoramidite 9, Spacer C12 CE Phosphoramidite y dSpacer CE Phosphoramidite, o combinaciones de los mismos.
- 10
10. La composición de la reivindicación 9, en la que el conector no nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en propanodiol y HEG.
- 15

**FIG. 1**

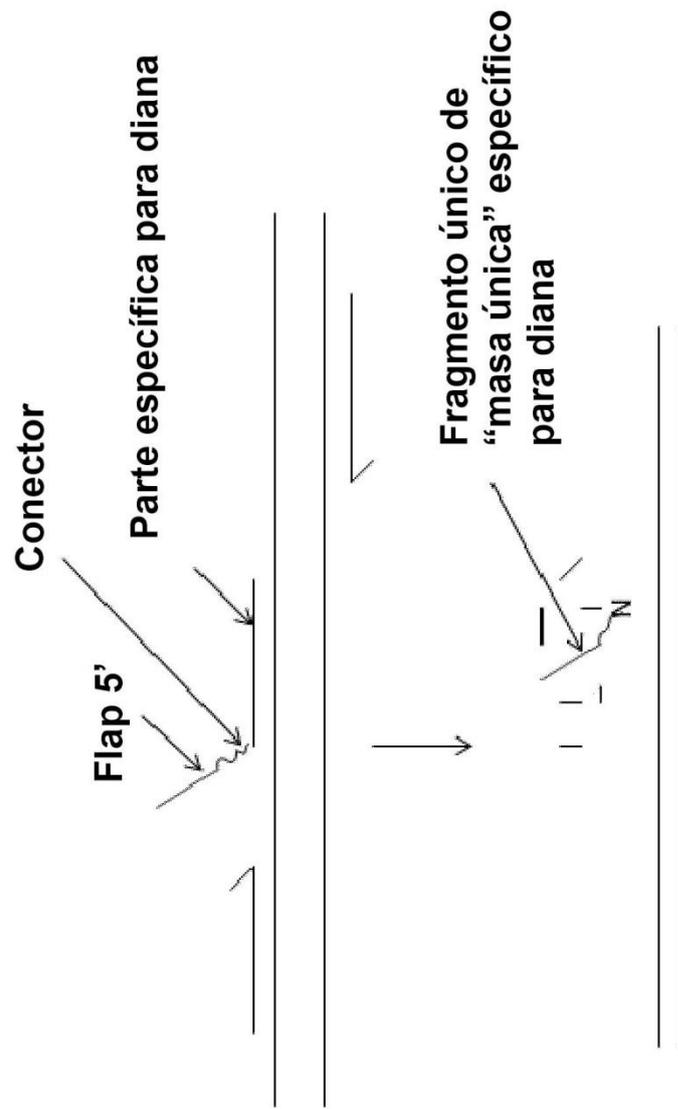


FIG. 2

