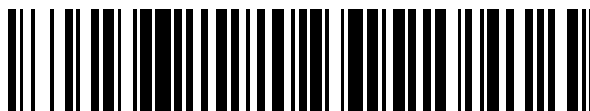


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 510**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6823 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2014 PCT/EP2014/069778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16041591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2014 E 14771272 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3194613**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2019

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacher Strasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:
GUPTA, AMAR

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 718 510 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 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 múltiple de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana.

10 Antecedentes de la invención

Son conocidos 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 tinte, PCR cinética selectiva de alelos y de cebadores Scorpion®. Estos procedimientos de ensayo no se multiplexan fácilmente debido a la necesidad de detectar un tinte 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 de oligonucleótidos que contienen una parte de "marcador" escindible que se puede separar y detectar fácilmente (por ejemplo, véase Chenna *et al.*, publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0053939, Van Den Boom, 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 exactitud los marcadores de detección con el ácido nucleico diana y todavía existe la necesidad de un procedimiento exacto para realizar una detección múltiple de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana.

Sumario de la invención

25 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. 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 múltiple rápida de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana.

35 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:

(a) preparar una mezcla de reacción poniendo en contacto una muestra que comprende un ácido nucleico diana con
40 (i) un par de cebadores oligonucleotídicos unido cada uno con un marcador de afinidad, 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 dicho primer producto de extensión y ceba la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria de dicho primer producto de extensión, y (ii) una sonda oligonucleotídica que comprende al menos dos partes distintas, en la que una primera parte está compuesta
45 de 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 dicha primera parte hibrida dentro de la secuencia de ácido nucleico diana unida por dicho par de cebadores oligonucleotídicos, y en la que dicha primera parte comprende además un marcador de afinidad, una modificación resistente a exonucleasas en o cerca del extremo 3' para evitar la escisión por una exonucleasa en dirección 3' a 5' y está bloqueada en el
50 extremo 3' para prohibir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico; y una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte compuesta de nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y que comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, en la que dicha segunda parte también comprende una modificación resistente a exonucleasas;

55 (b) amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana en una mezcla de reacción que comprende nucleótidos trifosfato y una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3' en condiciones que permiten la hibridación de dicho par de cebadores oligonucleotídicos y dicha sonda oligonucleotídica con la secuencia de ácido nucleico diana y la síntesis de productos de extensión del cebador a partir de dicho par de cebadores oligonucleotídicos mientras que la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de dicha polimerasa de ácido
60 nucleico puede escindir y liberar de la sonda oligonucleotídica hibridada fragmentos que contienen la segunda parte de la sonda oligonucleotídica con o sin nucleótidos adicionales de la primera parte de la sonda oligonucleotídica;

(c) someter la mezcla de reacción a una matriz de afinidad que reconoce y se une al marcador de afinidad en dicho par de cebadores oligonucleotídicos y en dicha sonda oligonucleotídica, retirando de este modo el exceso de
65 cebadores oligonucleotídicos y las sondas oligonucleotídicas no escindidas;

(d) tratar dichos fragmentos que contienen la segunda parte de la sonda oligonucleotídica con una exonucleasa en dirección 3' a 5' que escinde dichos fragmentos hasta la modificación resistente a exonucleasas produciendo de este modo un único fragmento que tiene un tamaño único de masa distinguible; y

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

10 En algunos modos de realización, durante la etapa (d), los nucleótidos trifosfato no incorporados se retiran mediante la adición de una enzima fosfatasa alcalina. En algunos modos de realización, la etapa (e) está precedida por una etapa de purificación de dicha mezcla de reacción para retirar los contaminantes de la espectrometría de masas.

15 En otro modo de realización, el marcador de afinidad comprende biotina y la matriz de afinidad comprende partículas recubiertas con estreptavidina. En otro modo de realización, la modificación resistente a exonucleasas se selecciona de fosforotioato, 2'-O-metil-ribonucleótido, espaciador de propanodiol, espaciador de HEG y nucleótido invertido.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una sonda oligonucleotídica en la que dicha sonda oligonucleotídica comprende al menos dos partes distintas, en la que una primera parte está compuesta de nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria de una región de la secuencia de ácido nucleico diana en la que dicha primera parte hibrida dentro de la secuencia de ácido nucleico diana unida por dicho par de cebadores oligonucleotídicos, y en la que dicha primera parte comprende además un marcador de afinidad, una modificación resistente a exonucleasas en o cerca del extremo 3' para prevenir la escisión por una exonucleasa en dirección 3' a 5', y 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 que comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, en la que dicha segunda parte también comprende una modificación resistente a exonucleasas.

30 En otro aspecto, la composición comprende además un par de cebadores oligonucleotídicos unido cada uno con un marcador de afinidad, en la que un primer cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en una cadena de una secuencia de ácido nucleico diana y ceba la síntesis de un primer producto de extensión en una reacción de amplificación, y en la que un segundo cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en dicho primer producto de extensión y ceba la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria de dicho primer producto de extensión en dicha reacción de amplificación.

35 En un modo de realización, el marcador de afinidad comprende biotina y la matriz de afinidad comprende partículas recubiertas con estreptavidina. En otro modo de realización, la modificación resistente a exonucleasas se selecciona de fosforotioato, 2'-O-metil-ribonucleótido, espaciador de propanodiol, espaciador de HEG y nucleótido invertido.

40 En otro aspecto, la invención proporciona una composición compuesta de una sonda oligonucleotídica en la que dicha 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 de ácido nucleico diana en la que dicha primera parte hibrida dentro de la secuencia de ácido nucleico diana unida por dicho par de cebadores oligonucleotídicos, en la que la primera parte también comprende una modificación en el extremo 5' que la hace resistente a la escisión por una exonucleasa en dirección 5' a 3' específica para cadena sencilla, y una segunda parte unida al extremo 3' de la primera parte compuesta de nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y que comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, en la que dicha segunda parte también comprende una modificación que la hace resistente a la escisión por la exonucleasa en dirección 5' a 3' específica para cadena sencilla.

50 En algunos modos de realización, la modificación resistente a exonucleasas en la segunda parte de la sonda oligonucleotídica comprende un análogo nucleotídico no escindible que se selecciona del grupo que consiste en fosforotioato, 2'-O-metil-ribonucleótido, espaciador de propanodiol, espaciador de HEG, nucleótido invertido o cualquier otra modificación que hace que el fragmento de oligonucleótido sea resistente a la escisión exonucleolítica más allá del punto de unión de la modificación. En otros modos de realización, la segunda parte de la sonda oligonucleotídica está compuesta de no nucleótidos que pueden ser cualquier resto orgánico o unidades repetidas (por ejemplo, (CH₂-CH₂-O)_n, etc.).

60 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para realizar una detección múltiple de alto rendimiento de más de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de: a) proporcionar una muestra que comprende los ácidos nucleicos diana; b) extraer los ácidos nucleicos totales de la muestra; c) proporcionar más de un par de cebadores oligonucleotídicos, en el que cada par de cebadores es complementario de y puede ceba la síntesis de productos de extensión de uno de los más de un ácido nucleico diana, y en el que cada cebador oligonucleotídico está unido con un marcador de afinidad; d) proporcionar más de una sonda oligonucleotídica, en la que cada sonda comprende al menos dos partes distintas caracterizadas por: (i) una primera parte compuesta de nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia que es al menos parcialmente

complementaria de una región de la secuencia de ácido nucleico diana en la que dicha primera parte hibrida dentro de la secuencia de ácido nucleico diana unida por dicho par de cebadores oligonucleotídicos, y en la que dicha primera parte comprende además un marcador de afinidad, una modificación resistente a exonucleasas en o cerca del extremo 3' para prevenir la escisión por una exonucleasa en dirección 3' a 5', y está bloqueada en el extremo 3' para prohibir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico; (ii) una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte compuesta de nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y que comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, en la que dicha segunda parte también comprende una modificación resistente a exonucleasas, en la que la segunda parte de cada sonda oligonucleotídica tiene un tamaño de masa distinguible en comparación con las segundas partes de otras sondas oligonucleotídicas

e) amplificar los más de un ácido nucleico diana en una mezcla de reacción que comprende los más de un par de cebadores oligonucleotídicos y las más de una sonda oligonucleotídica y en presencia de detergente poliónico, tampón de sal y metal, nucleótidos trifosfato y una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3' en condiciones que permiten la hibridación de cada par de cebadores oligonucleotídicos y cada sonda oligonucleotídica con su secuencia de ácido nucleico diana complementaria y la síntesis de productos de extensión de cebadores de cada par de cebadores oligonucleotídicos mientras que la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de dicha polimerasa de ácido nucleico puede escindir y liberar de cada una de las sondas oligonucleotídicas hibridadas fragmentos que contienen las segundas partes de cada una de las sondas oligonucleotídicas con o sin nucleótidos adicionales de las primeras partes de cada una de las sondas oligonucleotídicas;

f) someter la mezcla de reacción a una matriz de afinidad que reconoce y se une al marcador de afinidad en los más de un par de cebadores oligonucleotídicos y las más de una sonda oligonucleotídica;

g) filtrar la mezcla de reacción para retirar el exceso de cebadores oligonucleotídicos y las sondas oligonucleotídicas no escindidas y recoger un sobrenadante que comprende fragmentos de las segundas partes de las sondas oligonucleotídicas; h) añadir al sobrenadante una enzima fosfatasa alcalina para degradar los nucleótidos trifosfato no incorporados y una enzima exonucleasa en dirección 3' a 5' que escinde los fragmentos de las segundas partes de las sondas oligonucleotídicas hasta la modificación resistente a exonucleasas [que comprende propanodiol] produciendo de este modo fragmentos únicos de cada una de las segundas partes de las sondas oligonucleotídicas, por lo que cada fragmento único corresponde a un ácido nucleico diana y tiene un tamaño único de masa distinguible; i) retirar el detergente poliónico y el tampón de sal y metal mediante cromatografía en columna; j) usar espectrometría de masas para detectar la presencia de los fragmentos únicos que corresponde a la presencia de uno o más ácidos nucleicos diana en la muestra.

En un modo de realización, la etapa de amplificación se realiza en múltiples mezclas de reacción. En otro modo de realización, las etapas de retirada del detergente y espectrometría de masas se llevan a cabo en un procedimiento automatizado.

Breve descripción de los dibujos

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

La FIG. 2 representa un espectrograma de masas que muestra los fragmentos de oligonucleótidos después de la digestión por exonucleasa I del oligonucleótido **T₉JTTTGC**, en el que **J** es 2'-O-metil-uridina (A), espaciador de HEG (B) o espaciador de propanodiol (C).

La FIG. 3 representa el cromatograma de iones extraídos (EIC) después de CLEM de los fragmentos de una sonda mutante 5'-Flap EGFR T790M en una reacción de amplificación por PCR y seguido sin (A) o con (B) posterior digestión por exonucleasa I.

La FIG. 4 representa un diagrama de flujo detallado del procedimiento de la presente invención para realizar una detección múltiple de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana.

La FIG. 5 representa el cromatograma de control de iones específicos (SIM) del ensayo múltiple descrito en el ejemplo 3.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "muestra" como se usa 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), muestra 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" engloba 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 se puede unir a una sonda detectable (por ejemplo, un anticuerpo) o entrar de otro modo en contacto con ella, en la que la sonda detectable también comprende ácidos nucleicos que se pueden detectar por procedimientos de la invención. Como se usa en el presente documento, "sonda detectable" se refiere a cualquier molécula o agente que puede 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 de manera intercambiable 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), 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, englobarían análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de forma similar a los nucleótidos naturales y combinaciones y/o mezclas de los mismos. Por tanto, el término "nucleótidos" se refiere tanto a nucleótidos naturales como modificados o que no ocurren naturalmente, incluyendo nucleósidos tri, di y monofosfato, 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 variedad 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, incluyendo 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, un molde 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, que se pueden unir 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 de otro modo. 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 técnica.

Como se usa en el presente documento, "cebador oligonucleotídico" o, simplemente, "cebador" se refiere a una secuencia polinucleotídica que hibrida con una secuencia en un molde 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 del ácido nucleico. En modos de realización sin amplificación, se puede usar un cebador oligonucleotídico para crear una estructura que pueda 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 su uso en PCR se pueden diseñar basándose en principios conocidos por los expertos en la técnica.

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

Un marcador de "afinidad" es una molécula que se puede unir específicamente a su ligando molecular. La unión puede ser a través de enlaces covalentes o no covalentes (por ejemplo, iónicos, de hidrógeno, etc.). Como se usa en el presente documento, un marcador de afinidad, tal como biotina, se puede unir selectivamente a una matriz de afinidad, tal como microesferas o partículas recubiertas con estreptavidina. Como se usa en el presente documento, "partículas recubiertas con estreptavidina" se puede usar de manera intercambiable con "partículas recubiertas con avidina".

Una "matriz de afinidad" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que está fijada a la superficie de un soporte sólido o matriz sólida (por ejemplo, partículas de látex magnéticas, microesferas de vidrio) que se puede unir específicamente a su ligando molecular. La unión puede ser a través de enlaces covalentes o no covalentes. Como se usa en el presente documento, se puede unir selectivamente una matriz de afinidad, tal como partículas recubiertas con estreptavidina, a un marcador de afinidad, tal como biotina.

"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.

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 delección, duplicación, inversión y otras alteraciones conocidas en la técnica.

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 uno o más productos de degradación resultantes 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 como resultado una sensibilidad significativamente mejorada y permite una capacidad potenciada para realizar una reacción múltiple.

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 ligandos del surco menor, el enriquecimiento isotópico, la disminución isotópica, la introducción de deuterio y modificaciones de halógeno. Las modificaciones de nucleósidos también pueden incluir restos que aumentan la restricción 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 como resultado un nucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA) que sea resistente a la escisión por una nucleasa.

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, conjuntamente 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.

Una sonda "puede hibridar" o "se puede asociar" 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 puede hibridar con una secuencia de ARN diana que comprende la secuencia GCUGAU.

El término "agente de escisión" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier medio que puede escindir una sonda oligonucleotídica para proporcionar 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.

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 a menudo es 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* (Taq) o ADN polimerasa I de *E. coli*. La enzima puede ser natural, no modificada o modificada.

El término "escinde dichos fragmentos hasta la modificación resistente a exonucleasas" significa una actividad de escisión que escindiría los fragmentos hasta alcanzar la modificación resistente a exonucleasas por sí misma o un nucleótido definido localizado en posición proximal a la modificación resistente a exonucleasas. Para una actividad exonucleasa en dirección 3' a 5', el nucleótido definido en posición proximal a la modificación podría estar situado en la primera posición en dirección 3' inmediatamente después de la modificación. De forma alternativa, el nucleótido definido podría estar situado dos o tres o incluso más posiciones en dirección 3' desde la modificación, siempre que la escisión por la exonucleasa en dirección 3' a 5' termine sistemáticamente en la posición del nucleótido definido.

El término "propanodiol" o "espaciador de propanodiol" se refiere a 1,3-propanodiol y es sinónimo de propano-1,3-diol, 1,3-dihidroxiopropano 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. El término "nucleótido invertido" se refiere a un nucleótido en el que el resto glucídico está unido al resto glucídico de un nucleótido adyacente por medio de un enlace 3'-3'-fosfodiéster.

El término "contaminantes de espectrometría de masas" se refiere a cualquier sustancia que puede interferir en la detección de un fragmento con un tamaño de masa distinguible (MDF) mediante un espectrómetro de masas. Ejemplos de algunos contaminantes de espectrometría de masas se divulgan en Keller *et al.*, *Analytica Chimica Acta* (2008) 627:71-81.

"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, retrotranscriptasas, 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 son bien conocidas 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 de *Thermus aquaticus* (Taq), 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.

5 Polimerasa "modificada" se refiere a una polimerasa en la que al menos un monómero difiere de la secuencia de referencia, tal como una forma 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 quiméricas 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
10 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 Taq E615G, polimerasa TMA-25 E678G,
15 polimerasa TMA-30 E678G y similares.

El término "actividad nucleasa en dirección 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 cadenas de ácido nucleico, por la que los nucleótidos se retiran del extremo 5' de la cadena 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'. El término "exonucleasa en dirección 5'-3'" específica para cadena sencilla" se refiere a exonucleasas que actúan desde el extremo 5' con una preferencia por ácidos nucleicos monocatenarios sobre ácidos nucleicos bicatenarios. Ejemplos de dichas exonucleasas en dirección 5'-3' específicas para cadena sencilla incluyen: exonucleasa de *B. subtilis*, fosfodiesterasa de bazo,
20 exonucleasa II de levadura, exonucleasa V de levadura y exonucleasa de *Neurospora crassa*.

El término "exonucleasa en dirección 3' a 5'" o "actividad exonucleasa en dirección 3' a 5'" se refiere a una enzima o una actividad de una enzima por la que los nucleótidos se retiran del extremo 3' de la cadena de ácido nucleico. Ejemplos de exonucleasas en dirección 3' a 5' incluyen: exonucleasa I de *E. coli*, exonucleasa IV de *E. coli*,
30 exonucleasa V de *E. coli*, exonucleasa IV T4 de fago T4, ADN polimerasa T4 de fago T4, exonucleasa I de levadura, exonucleasa III de levadura, ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento Klenow, ADN polimerasa α de *Drosophila*, ADN polimerasa γ de *Drosophila* y fosfodiesterasa de veneno de serpiente.

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 en dirección 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.
40

La detección de un ácido nucleico diana utilizando la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' se puede realizar mediante un ensayo "TaqMan®" 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®, las sondas de detección marcadas que hibridan dentro de la región amplificada están presentes durante la reacción de amplificación. Las sondas se modifican para evitar que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de ADN. La amplificación se realiza usando una ADN polimerasa que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3' sobre ácidos nucleicos bicatenarios. 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 nucleasa en dirección 5' a 3' de la ADN polimerasa. Por tanto, la síntesis de una nueva cadena diana también da como resultado la degradación de una sonda, y la acumulación de producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de secuencias diana.
50

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 tintes fluorescentes, uno de los cuales puede extinguir la fluorescencia del otro tinte. Los tintes se unen a la sonda, típicamente con el tinte indicador o detector unido al extremo 5' y el tinte de extinción unido a un sitio interno, de modo que la extinción se produce cuando la sonda está en un estado no hibridado y de modo que la escisión de la sonda por la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de la ADN polimerasa se produce entre los dos tintes. La amplificación da como resultado la escisión de la sonda entre los tintes con una eliminación concomitante de la extinción y un aumento de la fluorescencia observable a partir del tinte 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.
60

65 Un ensayo de nucleasa en dirección 5' para la detección de un ácido nucleico diana puede emplear cualquier polimerasa que tenga una actividad nucleasa en dirección 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 *Thermosiphon*, 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, descritas 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 *Thermosiphon* que se puede usar es la ADN polimerasa de *Thermosiphon africanus*. Las secuencias de las ADN polimerasas de *Thermatoga maritima* y *Thermosiphon africanus* se publican en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US91/07035 con n.º de publicación 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, "ultrarrápida"). En algunos modos de realización, la detección de amplificación es cuantitativa, y la detección de amplificación es ultrarrápida. 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 tintes indicadores y tintes de extinción fluorescentes, 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 modo que esta parte se pueda unir al ácido nucleico diana que se va a detectar. Además, el extremo 3' de esta primera parte de la sonda está modificado o bloqueado de modo que no se pueda extender por la ADN polimerasa. El bloqueo del extremo 3' para prohibir la extensión por la polimerasa se puede lograr colocando un nucleótido con emparejamiento erróneo (es decir, no complementario) en el extremo 3' o modificando o retirando el hidroxilo 3' del nucleótido terminal. La primera parte también contiene una modificación resistente a exonucleasas en dirección 3' a 5' como se describe a continuación. 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 se puede unir al ácido nucleico diana (véase la FIG. 1). Esta parte Flap 5' puede estar compuesta de 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, (CH₂-CH₂-O)_n, etc.). La segunda parte también contiene una modificación que la hace resistente a la actividad de una exonucleasa en dirección 3' a 5' (mostrada como "X" en la FIG. 1). Esta modificación puede ser un análogo nucleotídico que no es escindible por una exonucleasa en dirección 3' a 5' y ejemplos de dicho análogo nucleotídico incluyen fosforotioato, 2'-O-metil-ribonucleótido, espaciador de propanodiol, espaciador de HEG, nucleótido invertido o cualquier otra modificación que hace que el fragmento de oligonucleótido sea resistente a la escisión exonucleolítica más allá del punto de unión de la modificación.

La presente invención proporciona cebadores oligonucleotídicos y sondas oligonucleotídicas. No se pretende que los procedimientos usados 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 determinadas bases usadas en nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m). 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; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza-8-aza 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-galactosilquiosina, 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-metiluracilo, 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, Escocia; con licencia de Exiqon A/S, Vedbæk, Dinamarca). Análogos nucleotídicos como estos también se describen, por ejemplo, en 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 determinados 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 disponibles comercialmente para la síntesis automatizada de oligonucleótidos. También se utilizan opcionalmente estrategias de síntesis de múltiples nucleótidos (por ejemplo, síntesis de trinucleótidos, etc.). Además, los ácidos nucleicos cebadores incluyen opcionalmente diversas modificaciones. En determinados 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, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611. Los cebadores y sondas también se pueden sintetizar con diversas otras modificaciones, como se describe en el presente documento o como se conoce de otro modo 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 variedad 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 diversos 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' por medio 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).

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), Proligo LLC (Boulder, CO) y muchas otras.

La presente invención también proporciona kits que comprenden los componentes necesarios para practicar los procedimientos de la invención, que pueden incluir uno o más de los siguientes: composiciones reivindicadas (las sondas y cebadores oligonucleotídicos reivindicados), enzimas (ADN polimerasa, exonucleasa, fosfatasa alcalina), reactivos para amplificación (nucleótidos trifosfato, sales y detergente) y reactivos para purificación (resina de afinidad). Por lo general, el kit está compartimentado para facilitar su uso y contiene recipientes que proporcionan los componentes para realizar los procedimientos. En algunos modos de realización, el kit comprende además una o más secuencias de ácido nucleico diana, incluyendo secuencias de ácido nucleico de control (para controles positivos y/o negativos).

El uso de la sonda oligonucleotídica de la presente invención en un ensayo de PCR TaqMan® da como resultado la generación de múltiples fragmentos de la sonda debido a los múltiples sitios de escisión presentes en la primera parte hibridada de la sonda (FIG. 1). Aunque estos fragmentos proporcionarían una "firma de masa distinguible" para un ácido nucleico diana dado en la posterior detección por espectrometría de masas, la presencia de múltiples ácidos nucleicos diana en una muestra (por ejemplo, un ensayo múltiple con más de diez ácidos nucleicos diana) generaría un número enorme de los fragmentos de "firma de masa distinguible" de modo que aparecerían fragmentos con masas muy similares originados a partir de diferentes ácidos nucleicos diana. Por tanto, sería difícil realizar una identificación exacta de la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana particular. Este problema se resuelve proporcionando una etapa de tratamiento que utiliza una exonucleasa en dirección 3' a 5' que escindiría los fragmentos hasta alcanzar la modificación resistente a exonucleasas por sí misma o en un nucleótido definido

localizado en el lado 3' con respecto a la modificación resistente a exonucleasas en la parte Flap 5' y no escindiría los fragmentos más allá. Como resultado, se generaría un único fragmento de "masa única" para cada ácido nucleico diana individual y se detectaría por espectrometría de masas.

5 Los fragmentos con tamaños de masa distinguible (MDF) se distinguen por un atributo físico o rasgo característico de detección particular, incluyendo pero no limitado a longitud, masa, carga o proporción carga-masa. En un modo de realización, el rasgo característico de detección es la masa. En otro modo de realización, el rasgo característico de detección es la carga y la masa. La separación y detección de MDF se puede lograr mediante separación electroforética, por ejemplo, mediante electroforesis en gel, electroforesis capilar, isoelectroenfoque, electroforesis por microfluidos. De forma alternativa, la separación y la detección se pueden lograr usando cromatografía de líquidos, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase inversa, cromatografía de líquidos de ultraalto rendimiento (UPLC) y similares. 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 de una o más sondas oligonucleotídicas se liberan y se desorben selectivamente a partir de una matriz espectral de masa de modo que los cebadores no selectivos y las sondas oligonucleotídicas (es decir, el ácido nucleico diana no está presente) no se desorben. Para estos modos de realización, los MDF se deben desorber más eficazmente 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.

25 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 lograr 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 captura. También se puede usar un ligando de captura y un agente de captura para añadir masa a la parte restante del MDF de modo 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.

35 También se puede usar una etapa de separación para retirar 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 retirar la sal de una muestra. La elección del procedimiento de separación puede depender de la cantidad de muestra. Por ejemplo, cuando están disponibles pequeñas cantidades de muestra o se usa 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 usado. Por ejemplo, la eficacia de la desorción/ionización por láser asistida por matriz y la ionización por electrospray se puede mejorar retirando 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 como resultado una menor eficacia de ionización.

50 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 proporción masa-carga. El espectrómetro de masas calcula a continuación 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 proporción masa-carga.

55 La espectrometría de masas es una técnica sensible y exacta 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 proporción masa-carga de los iones, que es y se convierte en una medición de masa para estos 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 a través del 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.

65 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, como se describen 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.

La capacidad de 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 MDF, por ejemplo, a partir de un experimento múltiple. Por ejemplo, en un experimento múltiple con un gran número de MDF, puede ser ventajoso seleccionar indicadores individuales de un grupo de indicadores similares y, a continuación, 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.

Los espectrómetros de masas pueden resolver iones con pequeñas diferencias de masa y medir la masa de iones con un alto grado de exactitud. 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 exactitud 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 de usar grandes conjuntos de sondas marcadas es una ventaja en el diseño de experimentos múltiples.

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 logran una alta sensibilidad utilizando una gran parte de los iones que se forman en la fuente de iones y transmitiendo eficazmente dichos iones a través del analizador de masas hasta el detector. Debido a este alto nivel de sensibilidad, se pueden medir incluso cantidades limitadas de muestra usando la espectrometría de masas. Esto puede ser una ventaja en un experimento múltiple donde la cantidad de cada especie de MDF puede ser pequeña.

Los procedimientos 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.

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 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 eficacia a los detectores de partículas que registran la llegada de estos 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 de 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 Δm 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.

Diversos tipos de espectrómetros de masas están disponibles o se pueden producir con diversas 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 de líquidos en columna capilar o puede ser una sonda directa o fase tal como se usa 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 diversos 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 como resultado 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 eficacia 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 solución, lo cual es práctico para analizar MDF que están en solución. 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 solución, es compatible con muestras de sistemas de cromatografía de líquidos. Por ejemplo, un espectrómetro de masas puede tener una entrada para un sistema de cromatografía de líquidos, 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 de líquidos 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 retirar sales u otros componentes también 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 eficacia del procedimiento de ionización y, por tanto, mejorar 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 diversos 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 proporcionar 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 conjuntos 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 del aumento de los campos aplicados de modo 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 proyectado, mientras se excluyen los iones de un intervalo de masas mayor o menor. La capacidad de seleccionar un intervalo de masas puede disminuir el ruido de fondo en el ensayo y, por tanto, aumentar la proporción señal-ruido. Además, se puede usar 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 lograr 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. A diferencia de 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 de forma ultrarrápida. La parte de cromatografía de gases (CG) del sistema separa la mezcla química en pulsos 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 usar 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 denominan sistemas de tándem en el espacio porque los dos analizadores de masas están separados en el espacio, normalmente por una celda de colisión. Los sistemas de espectrómetros de masas en tándem también incluyen sistemas de tándem en el 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, a continuación, realizar un análisis de masas.

Los espectrómetros de masas de la categoría tándem en el espacio tienen más de un analizador de masas. Por ejemplo, un sistema de espectrómetro de masas cuadrupolar en tándem puede tener un primer filtro de masas cuadrupolar, seguido de una celda de colisión, seguido de un segundo filtro de masas cuadrupolar y, a continuación, el detector. Otra disposición consiste en usar 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 el 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 el tiempo.

Se pueden realizar diversos 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 denominados "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

5 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, a continuación, se fragmentan en la celda de colisión. Los iones formados se analizan a continuación por su masa explorando el segundo analizador de masas. En un tercer ejemplo, denominado exploración de iones
 10 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 múltiples.

15 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
 20 usar 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 procedimientos ejemplares para determinar el Ct se describen, por ejemplo, en Heid *et al.*, Genome Methods 6:986-94, 1996, con referencia a las sondas de hidrólisis.

25 Ejemplos

Ejemplo 1

Evaluación de la modificación resistente a exonucleasas

30 Para evaluar las diferentes modificaciones resistentes a exonucleasas que se pueden usar para practicar los procedimientos de la presente invención, se sintetizó el siguiente oligonucleótido: T₉TTTGC (SEQ ID NO: 1), en el que T₉ representa la parte Flap 5' y J representa la modificación. Las modificaciones usadas en un experimento particular incluyeron fosforotioato, 2'-amino-uridina, 2'-fluoro-uridina, 2'-O-metil-uridina, un espaciador de propanodiol y un espaciador de HEG (nombre completo). Se suspendieron 1 μM de cada oligonucleótido en 1 × tampón de
 35 exonucleasa I (New England Biolabs) y 2 unidades de exonucleasa I (New England Biolabs) y se incubaron a 37 °C durante treinta minutos. Las reacciones se detuvieron enfriando en hielo y los productos digeridos con exonucleasa se analizaron mediante cromatografía de líquidos con espectrometría de masas (CLEM) en un instrumento Agilent Q-TOF 6530. Los productos digeridos con exonucleasa I a partir de oligonucleótidos que contenían tres de las modificaciones, 2'-O-metil-uridina, espaciador de HEG y espaciador de propanodiol, se muestran en los espectrogramas de masas de la FIG. 2 A-C. Estos resultados muestran que estas modificaciones son eficaces para
 40 bloquear la digestión del oligonucleótido más allá del punto de unión de la modificación.

Ejemplo 2

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

45 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 (EGFR) humano. Se usaron los siguientes cebadores para la amplificación de una región del gen EGFR que incluye la posición de la mutación T790M:

50 Cebador directo: 5'-CCTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGA-3' (SEQ ID NO: 2)

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

55 Para la detección se utilizó la siguiente sonda Flap 5', 5'-C₆ECCTGCACGGTGGAGGTGAGGCAGP-3' (SEQ ID NO: 4), en la que C₆ representa la parte no complementaria del Flap 5', E representa 1,3-propanediol y P representa fosfato. Las mezclas de reacción de PCR se prepararon en una placa de 96 pocillos con las siguientes concentraciones finales: Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), cloruro de potasio 80-100 mM, dATP, dCTP y dGTP 200 μM cada uno, dUTP 400 μM, 200 nM de cada cebador, sonda Flap 5' 200 nM, ADN diana (1000-100 000 copias de plásmido de EGFR), ADN polimerasa (con actividad nucleasa en dirección 5') 20 nM, EDTA 0,1 mM, acetato de magnesio 2,5 mM. 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). Al final de la reacción de PCR, se añadieron 10 unidades de exonucleasa I (New England Biolabs) a algunos de los
 65 pocillos de muestra y la solución se incubó a 37 °C durante 30 minutos, seguido de enfriamiento con hielo.

Los productos de reacción se pasaron a través de columnas de centrifugación de intercambio aniónico TopTip (Glygen Corp.) para la retirada del detergente y otros contaminantes, y a continuación se cargaron en el instrumento Agilent Q-TOF 6530 y los fragmentos se analizaron por CLEM. La FIG. 3 muestra el cromatograma de iones extraídos (EIC) de los fragmentos de la sonda Flap 5' antes de la digestión (A) y después de la digestión (B) por exonucleasa I. Se observaron dos picos distintos en la reacción sin digestión con exonucleasa I con las masas esperadas que corresponden a fragmentos de sonda con las secuencias C₆ECC y C₆ECCT. Sin embargo, después de la digestión con exonucleasa I, solo se observó un único pico distinto con una masa que corresponde al fragmento de sonda C₆CE y se dejaron de observar los picos que corresponden a C₆ECC y C₆ECCT.

10 **Ejemplo 3**

Ensayo múltiple utilizando múltiples sondas Flap 5'

15 En la FIG. 4 se muestra un diagrama de flujo detallado sobre cómo se usan los procedimientos de la presente invención para realizar la detección múltiple de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana. Se realizó un ensayo de PCR para detectar simultáneamente una secuencia de delección del exón 19, una mutación T790M (cambio de nucleótido 2369 C->T), una mutación L858R y una secuencia de control interno del exón 28, del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano. En cada caso se usaron cebadores específicos de alelo para la amplificación de una región del gen EGFR que incluye la posición de la mutación específica. Para la detección, se utilizaron las siguientes sondas Flap 5':

T790M: 5'-GGTGGAGETTTGCACGGTGGAGGTGAGGCAGEBT-3' (SEQ ID NO: 5)

25 Exón 19 Del: 5'-GGGAGGGEGCCCAGAGCCATGGACCCCCACACAGEBT-3' (SEQ ID NO: 6)

L858R: 5'-TTCTTCTTECTTTACTGGTAAAACACCGCAGCATGTEBT-3' (SEQ ID NO: 7)

30 Exón 28: 5'-ACCACCACCECTTAAAGCCCCGTGGCTCTGTGCAGAAEBT-3' (SEQ ID NO: 8). Para cada secuencia de sonda, E representa 1,3-propanodiol y B representa biotina que está unida a la sonda oligonucleotídica por medio de un conector propanodiol (E).

35 Las mezclas de reacción de PCR se prepararon en una placa de 96 pocillos con las siguientes concentraciones finales: Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), cloruro de potasio 80-100 mM, dATP, dCTP y dGTP 200 µM cada uno, dUTP 400 µM, 50 nM de cada cebador, sonda Flap 5' 50 nM cada una, ADN diana (10 copias de plásmido de EGFR para cada mutación), ADN polimerasa (con actividad nucleasa en dirección 5') 20 nM, EDTA 0,1 mM, acetato de magnesio 2,5 mM. La amplificación y el análisis se realizaron con el instrumento Roche LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). 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 55 ciclos de 92 °C (10 segundos) a 62 °C (25-30 segundos). Al concluir la reacción de PCR, la mezcla de reacción se incubó con 75 µl de resina de avidina inmovilizada (G Biosciences, Parte 376A-A, lote 112106) que se había transferido previamente a 1 × tampón de exonucleasa I en un tubo Eppendorf. Se añadió la muestra (pocillo de PCR, 50 µl) y la mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos. La muestra se transfirió a continuación a un filtro de columna de espín y se centrifugó a 500 × g (2400 rpm). La resina se desechó, y la fracción no adsorbida se procesó adicionalmente como se describe a continuación.

45 A la muestra especificada se le añadió 1 µl de 20 unidades/µl de exonucleasa I y 3 µl de 1 unidad/µl de fosfatasa alcalina de camarón, y la mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo colocando la solución en hielo.

50 Los productos de reacción se pasaron a través de columnas de espín de intercambio aniónico TopTip (Glygen Corp.) para retirar el detergente y otros contaminantes y, a continuación, se cargaron en el inyector automático, y se analizaron por CLEM en un instrumento Agilent QQQ 6460 en modo SIM, con monitorización a m/z 1518,7, 1383,3, 1345,8 y 1320,5. La FIG. 5 muestra el cromatograma de control de iones específicos (SIM) de los fragmentos de cada una de las sondas Flap 5' después de la digestión por exonucleasa I. Se observaron cuatro picos distintos en la digestión de la reacción con las masas esperadas que corresponden a los fragmentos de sonda con las secuencias que se muestran a continuación:

Exón 28: ACCACCACC<espaciador de 1,3-propanodiol>C (m/z 1518,7, 2.º estado de carga)

55 L858R: TTCTTCTT<espaciador de 1,3-propanodiol>C (m/z 1383,3, 2.º estado de carga)

60 Exón 19 Del: GGGAGGG<espaciador de 1,3-propanodiol>G (m/z 1345,8, 2.º estado de carga)

T790M: GGTGGAG<espaciador de 1,3-propanodiol>T (m/z 1320,5, 2.º estado de carga)

65 Estos picos solo se observaron cuando las dianas correspondientes estaban presentes. No se observó ningún pico de los controles no diana (datos no mostrados).

LISTADO DE SECUENCIAS

| | | |
|----|---|-----------|
| 5 | <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Molecular Systems, Inc. | |
| | <120> IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA POR ESCISIÓN DE SONDA BASADA EN ESTRUCTURA | |
| 10 | <130> 32318 WO-HS | |
| | <160> 8 | |
| 15 | <170> PatentIn versión 3.5 | |
| | <210> 1 | |
| | <211> 14 | |
| | <212> ADN | |
| 20 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sonda sintética | |
| 25 | <220> | |
| | <221> misc_feature | |
| | <222> (9)..(10) | |
| | <223> Modificación resistente a exonucleasas | |
| 30 | <400> 1 tttttttttt ttgc | 14 |
| | <210> 2 | |
| | <211> 24 | |
| | <212> ADN | |
| 35 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador sintético | |
| 40 | <400> 2 cctccctcca ggaagcctac gtga | 24 |
| | <210> 3 | |
| | <211> 22 | |
| 45 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador sintético | |
| 50 | <220> | |
| | <221> base_modificada | |
| | <222> (21)..(21) | |
| 55 | <223> f-butyl-bencil-dC | |
| | <400> 3 cagtcgaagg gcatgagctg ca | 22 |
| 60 | <210> 4 | |
| | <211> 29 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 65 | <220> | |

| | | | |
|----|-------|---|----|
| | <223> | Sonda sintética | |
| | <220> | | |
| | <221> | misc_feature | |
| 5 | <222> | (6)..(7) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| | <400> | 4 | |
| | | cccccccctg cacggtggag gtgaggcag | 29 |
| 10 | <210> | 5 | |
| | <211> | 31 | |
| | <212> | ADN | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| 15 | <220> | | |
| | <223> | Sonda sintética T790M | |
| | <220> | | |
| 20 | <221> | misc | |
| | <222> | (7)..(8) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| | <220> | | |
| 25 | <221> | misc | |
| | <222> | (30)..(31) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| | <220> | | |
| 30 | <221> | misc | |
| | <222> | (30)..(31) | |
| | <223> | Biotina | |
| | <400> | 5 | |
| 35 | | ggtggagttt gcacggtgga ggtgaggcag t | 31 |
| | <210> | 6 | |
| | <211> | 34 | |
| | <212> | ADN | |
| 40 | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Sonda sintética exón 19 Del | |
| 45 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (7)..(8) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| 50 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (33)..(34) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| 55 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (33)..(34) | |
| | <223> | Biotina | |
| 60 | <400> | 6 | |
| | | gggagggggcc cagagccatg gacccccaca cagt | 34 |
| | <210> | 7 | |
| | <211> | 37 | |
| 65 | <212> | ADN | |
| | <213> | Secuencia artificial | |

ES 2 718 510 T3

| | | | |
|----|-------|--|-----------|
| | <220> | | |
| | <223> | Sonda sintética L858R | |
| 5 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (8)..(9) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| 10 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (36)..(37) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| 15 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (36)..(37) | |
| | <223> | Biotina | |
| 20 | <400> | 7 | |
| | | ttctttcttct ttactggtga aaacaccgca gcatggt | 37 |
| | <210> | 8 | |
| | <211> | 38 | |
| 25 | <212> | ADN | |
| | <213> | Secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | Sonda sintética éxon 28 | |
| 30 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (9)..(10) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| 35 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (37)..(38) | |
| | <223> | 1,3-propanodiol | |
| 40 | <220> | | |
| | <221> | misc | |
| | <222> | (37)..(38) | |
| | <223> | Biotina | |
| 45 | <400> | 8 | |
| | | accaccaccc ttaaaggccc gctggctctg tgcagaat | 38 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra que comprende un ácido nucleico diana con
- 10 (i) un par de cebadores oligonucleotídicos unido cada uno con un marcador de afinidad, 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 dicho primer producto de extensión y ceba la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria de dicho primer producto de extensión, y
- 15 (ii) una sonda oligonucleotídica que comprende al menos dos partes distintas,
- en la que una primera parte compuesta de 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 dicha primera parte hibrida dentro de la secuencia de ácido nucleico diana unida por dicho par de cebadores oligonucleotídicos, y en la que dicha primera parte comprende además un marcador de afinidad, una modificación resistente a exonucleasas en o cerca del extremo 3' para evitar la escisión por una exonucleasa en dirección 3' a 5' y está bloqueada en el extremo 3' para prohibir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico; y
- 20 una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte compuesta de nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y que comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, en la que dicha segunda parte también comprende una modificación resistente a exonucleasas;
- 25 (b) amplificar dicha secuencia de ácido nucleico diana en una mezcla de reacción que comprende nucleótidos trifosfato y una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3' en condiciones que permiten la hibridación de dicho par de cebadores oligonucleotídicos y dicha sonda oligonucleotídica con la secuencia de ácido nucleico diana y la síntesis de productos de extensión del cebador a partir de dicho par de cebadores oligonucleotídicos mientras que la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de dicha polimerasa de ácido nucleico puede escindir y liberar de la sonda oligonucleotídica hibridada fragmentos que contienen la segunda parte de la sonda oligonucleotídica con o sin nucleótidos adicionales de la primera parte de la sonda oligonucleotídica;
- 30 (c) someter la mezcla de reacción a una matriz de afinidad que reconoce y se une al marcador de afinidad en dicho par de cebadores oligonucleotídicos y en dicha sonda oligonucleotídica, retirando de este modo el exceso de cebadores oligonucleotídicos y las sondas oligonucleotídicas no escindidas;
- 35 (d) tratar dichos fragmentos que contienen la segunda parte de la sonda oligonucleotídica con una exonucleasa en dirección 3' a 5' que escinde dichos fragmentos hasta la modificación resistente a exonucleasas produciendo de este modo un único fragmento que tiene un tamaño único de masa distinguible; y
- 40 (e) detectar la presencia o ausencia del fragmento único, detectando de este modo la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra.
- 45 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dos o más sondas oligonucleotídicas se usan para detectar dos o más ácidos nucleicos diana en una única reacción multiplexada.
- 50 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha modificación resistente a exonucleasas se selecciona del grupo que consiste en fosforotioato, 2'-O-metil-ribonucleótido, espaciador de propanodiol, espaciador de HEG y nucleótido invertido.
- 55 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que durante la etapa de tratamiento (d), los nucleótidos trifosfato no incorporados se retiran mediante la adición de una enzima fosfatasa alcalina.
- 60 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de detección (e) se realiza mediante separación electroforética, cromatografía de líquidos o espectrometría de masas.
- 65

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de detección (e) se realiza mediante espectrometría de masas, usando 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 con analizador de trampa de iones, cromatografía de líquidos (CL)-EM, cromatografía de gases (CG)-EM o EM por movilidad iónica (MI).
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la etapa de detección (e) está precedida de una etapa de purificación de dicha mezcla de reacción para retirar los contaminantes de la espectrometría de masas.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa termoestable.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el marcador de afinidad comprende biotina y la matriz de afinidad comprende partículas recubiertas con estreptavidina.
10. Una composición compuesta de una sonda oligonucleotídica en la que dicha sonda oligonucleotídica comprende al menos dos partes distintas, en la que una primera parte está compuesta de nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia al menos parcialmente complementaria de una región de una secuencia de ácido nucleico diana de modo que dicha primera parte se puede unir a dicha región de la secuencia de ácido nucleico diana, y en la que dicha primera parte comprende además un marcador de afinidad, una modificación resistente a exonucleasas en o cerca del extremo 3' para evitar la escisión por una exonucleasa en dirección 3' a 5', y está bloqueada en el extremo 3' para prohibir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico; y en la que una segunda parte está unida al extremo 5' de la primera parte y está compuesta por 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 dicha segunda parte también comprende una modificación resistente a exonucleasas seleccionada del grupo que consiste en fosforotioato, 2'-O-metil-ribonucleótido, espaciador de propanodiol, espaciador de HEG y nucleótido invertido.
11. La composición de la reivindicación 10 que comprende además un par de cebadores oligonucleotídicos unido cada uno con un marcador de afinidad, en la que un primer cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en una cadena de una secuencia de ácido nucleico diana y ceba la síntesis de un primer producto de extensión en una reacción de amplificación, y en la que un segundo cebador oligonucleotídico comprende una secuencia complementaria de una región en dicho primer producto de extensión y ceba la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria de dicho primer producto de extensión en dicha reacción de amplificación.
12. Un procedimiento *in vitro* para realizar la detección múltiple de alto rendimiento de más de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de:
- proporcionar una muestra que comprende los ácidos nucleicos diana;
 - extraer los ácidos nucleicos totales de la muestra;
 - proporcionar más de un par de cebadores oligonucleotídicos, en el que cada par de cebadores es complementario de y puede ceba la síntesis de productos de extensión de uno de los más de un ácido nucleico diana, y en el que cada cebador oligonucleotídico está unido con un marcador de afinidad;
 - proporcionar más de una sonda oligonucleotídica, en la que cada sonda comprende al menos dos partes distintas caracterizadas por:
 - una primera parte compuesta de nucleótidos estándar con o sin análogos nucleotídicos que comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria de una región de una de las más de una secuencia de ácido nucleico diana en la que dicha primera parte hibrida dentro de la secuencia de ácido nucleico diana unida por uno de los más de un par de cebadores oligonucleotídicos, y en la que dicha primera parte comprende además un marcador de afinidad, una modificación resistente a exonucleasas en o cerca del extremo 3' para evitar la escisión por una exonucleasa en dirección 3' a 5', y está bloqueada en el extremo 3' para prohibir la extensión por una polimerasa de ácido nucleico;
 - una segunda parte unida al extremo 5' de la primera parte compuesta de nucleótidos o no nucleótidos o tanto nucleótidos como no nucleótidos, y que comprende una secuencia que no es complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana, en la que dicha segunda parte también comprende una modificación resistente a exonucleasas, en la que la segunda parte de cada sonda oligonucleotídica tiene un tamaño de masa distinguible en comparación con las segundas partes de otras sondas oligonucleotídicas
 - amplificar los más de un ácido nucleico diana en una mezcla de reacción que comprende los más de un

- 5 par de cebadores oligonucleotídicos y las más de una sonda oligonucleotídica y en presencia de detergente poliiónico, tampón de sal y metal, nucleótidos trifosfato y una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3' en condiciones que permiten la hibridación de cada par de cebadores oligonucleotídicos y cada sonda oligonucleotídica con su secuencia de ácido nucleico diana complementaria y la síntesis de productos de extensión de cebadores de cada par de cebadores oligonucleotídicos mientras que la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de dicha polimerasa de ácido nucleico puede escindir y liberar de cada una de las sondas oligonucleotídicas hibridadas fragmentos que contienen las segundas partes de cada una de las sondas oligonucleotídicas con o sin nucleótidos adicionales de las primeras partes de cada una de las sondas oligonucleotídicas;
- 10 f) someter la mezcla de reacción a una matriz de afinidad que reconoce y se une al marcador de afinidad en los más de un par de cebadores oligonucleotídicos y las más de una sonda oligonucleotídica;
- 15 g) filtrar la mezcla de reacción para retirar el exceso de cebadores oligonucleotídicos y las sondas oligonucleotídicas no escindidas y recoger un sobrenadante que comprende fragmentos de las segundas partes de las sondas oligonucleotídicas;
- 20 h) añadir al sobrenadante una enzima fosfatasa alcalina para degradar los nucleótidos trifosfato no incorporados y una enzima exonucleasa en dirección 3' a 5' que escinde los fragmentos de las segundas partes de las sondas oligonucleotídicas hasta la modificación resistente a exonucleasas produciendo de este modo fragmentos únicos de cada una de las segundas partes de las sondas oligonucleotídicas, por lo que cada fragmento único corresponde a un ácido nucleico diana y tiene un tamaño único de masa distinguible;
- 25 i) retirar el detergente poliiónico y el tampón de sal y metal mediante cromatografía en columna;
- j) detectar la presencia de los fragmentos únicos que corresponde a la presencia de los uno o más ácidos nucleicos diana en la muestra.
- 30 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la etapa de detección j) se realiza mediante electroforesis en gel, cromatografía de líquidos, electroforesis por microfluidos o espectrometría de masas.
- 35 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la etapa de detección (j) se realiza mediante espectrometría de masas, usando 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 con analizador de trampa de iones, cromatografía de líquidos (CL)-EM, cromatografía de gases (CG)-EM o EM por movilidad iónica (MI).
- 40 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que las etapas i) y j) se realizan mediante un procedimiento automatizado.

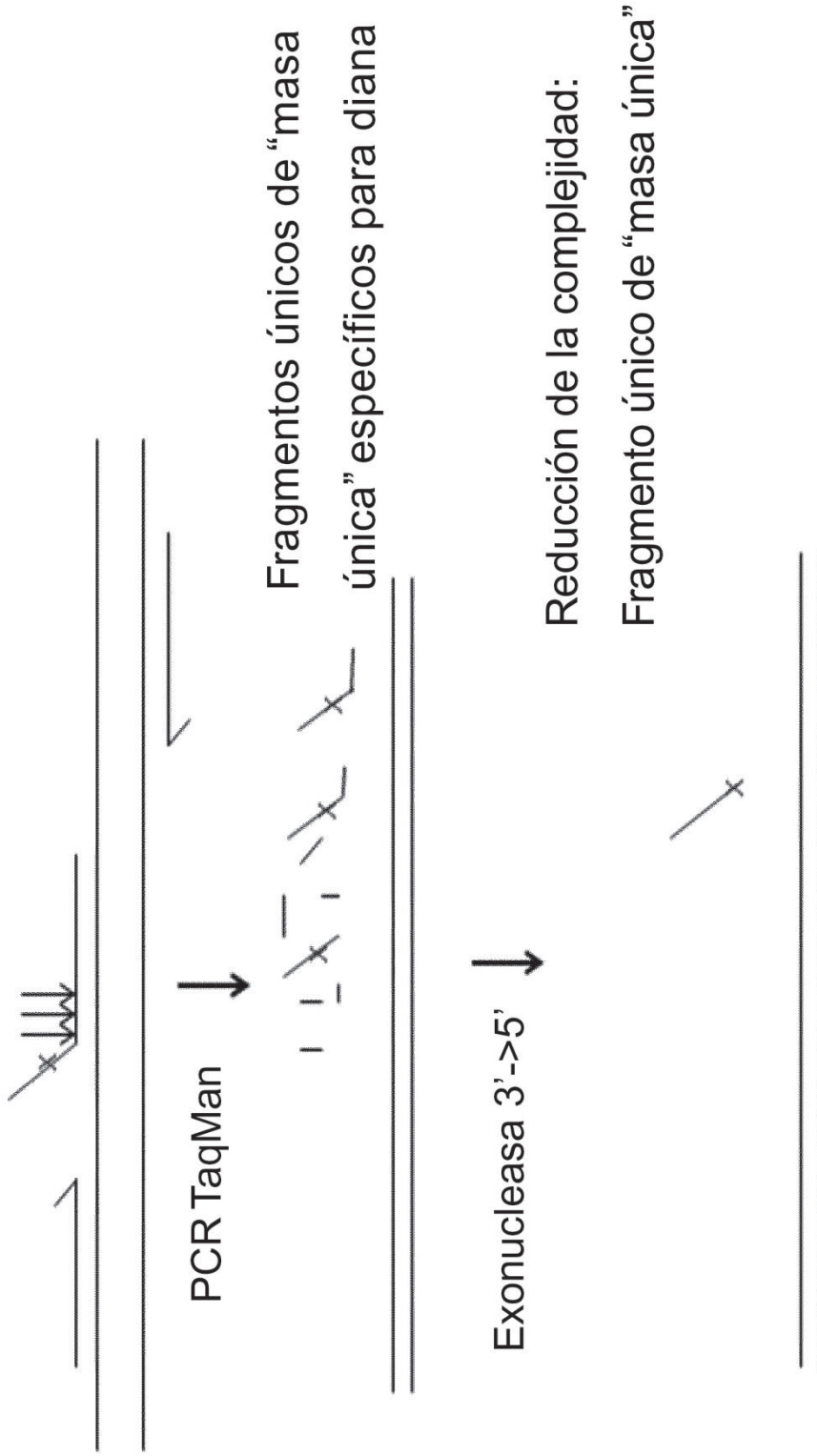


FIG. 1

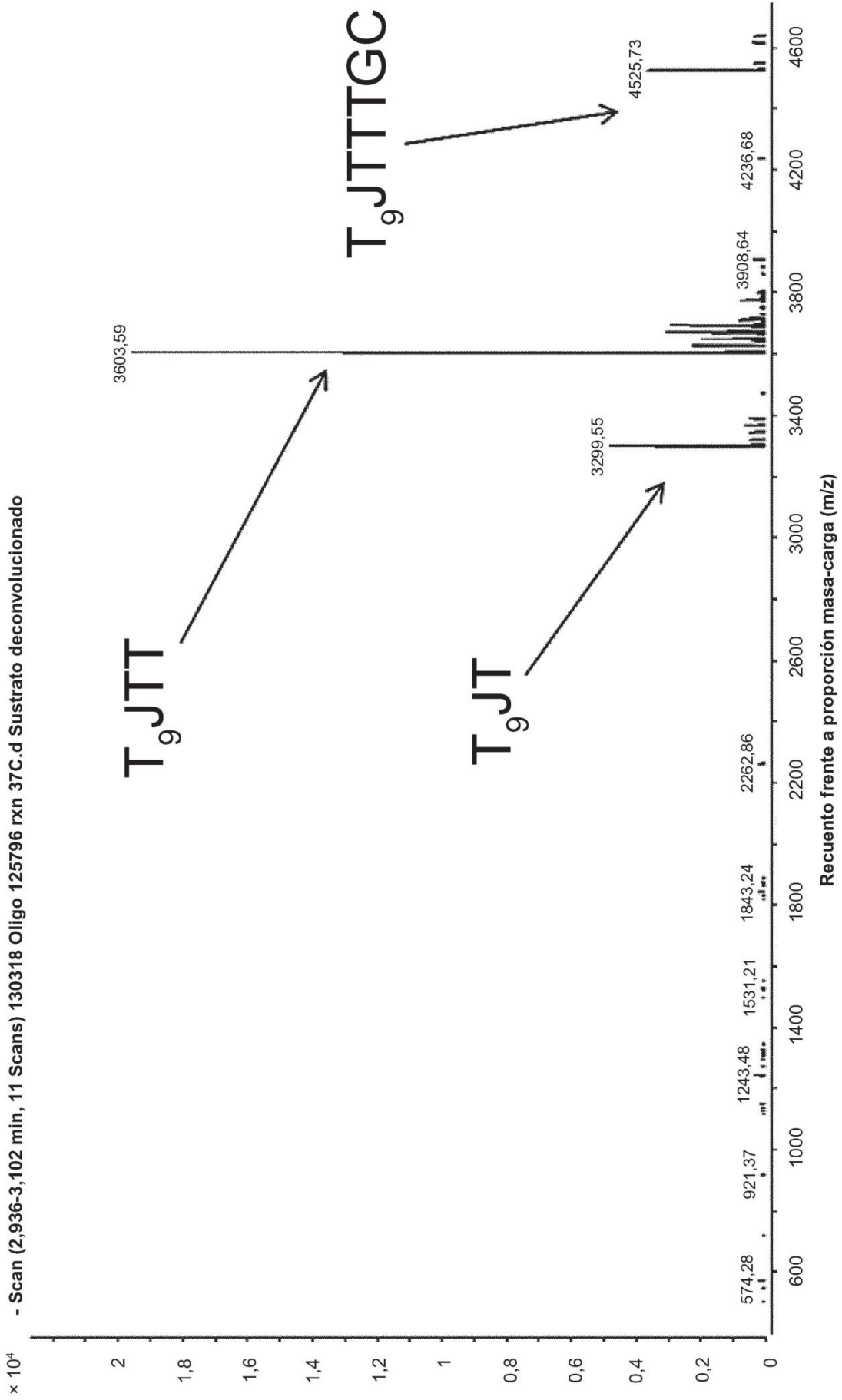


FIG. 2A

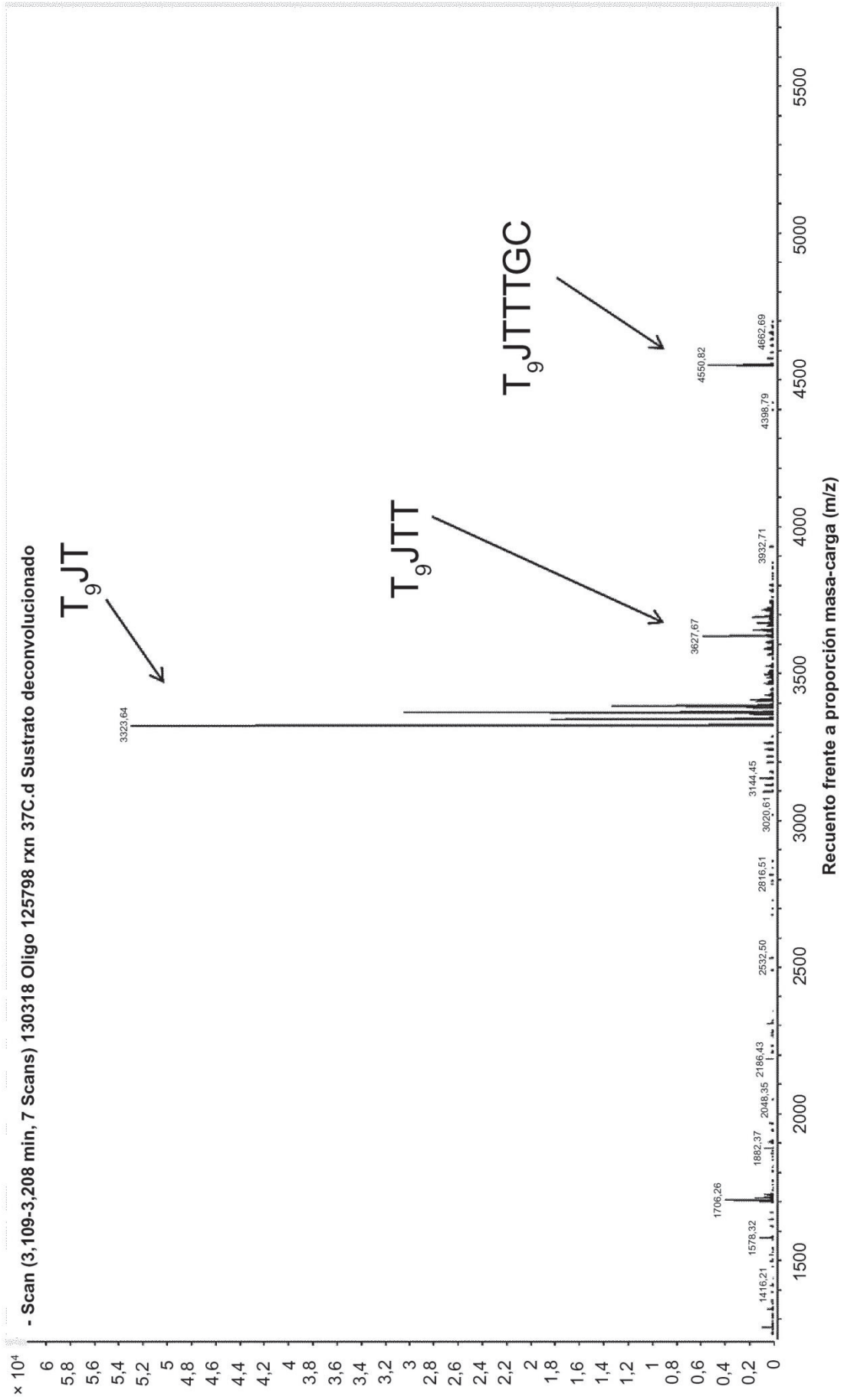


FIG. 2B

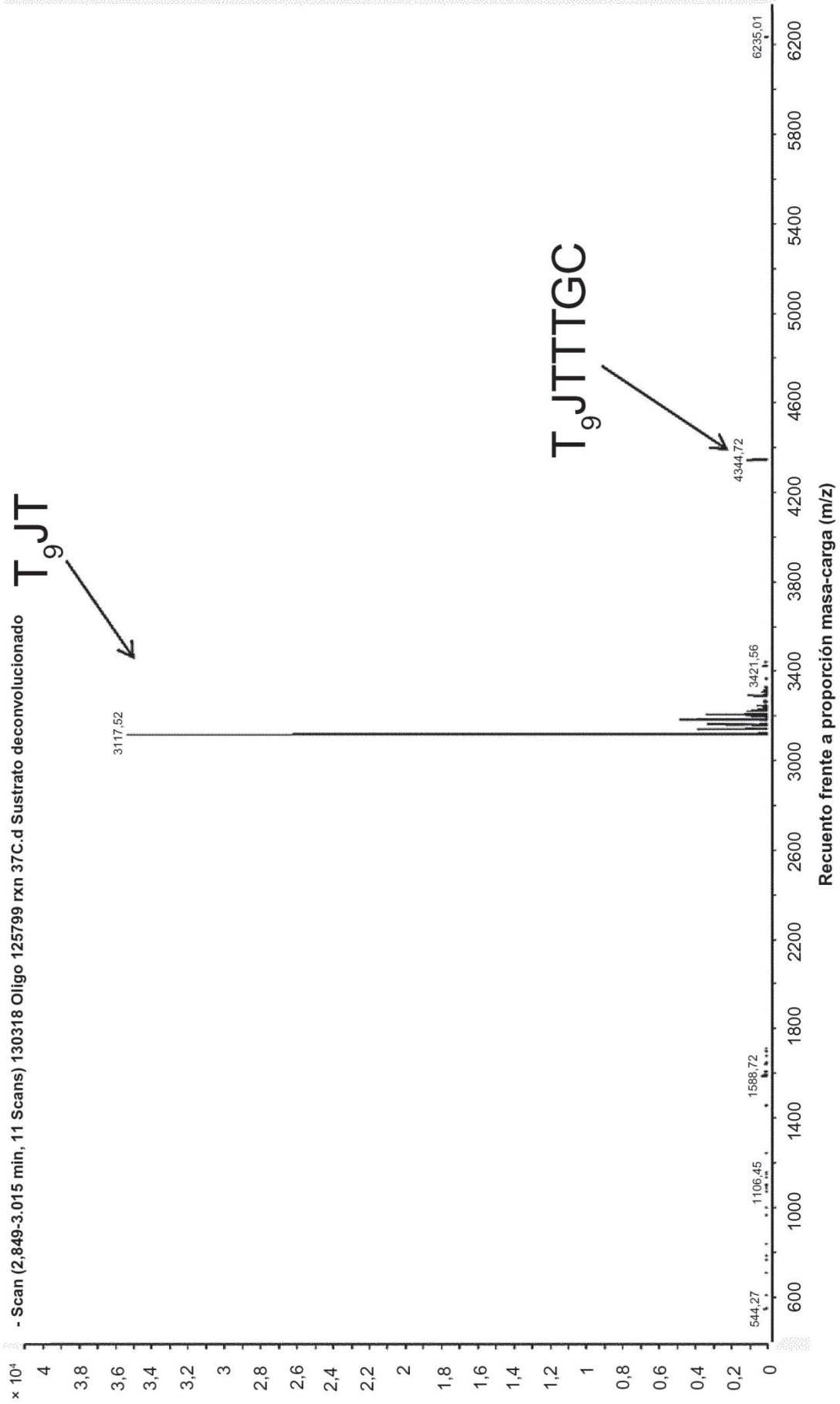


FIG. 2C

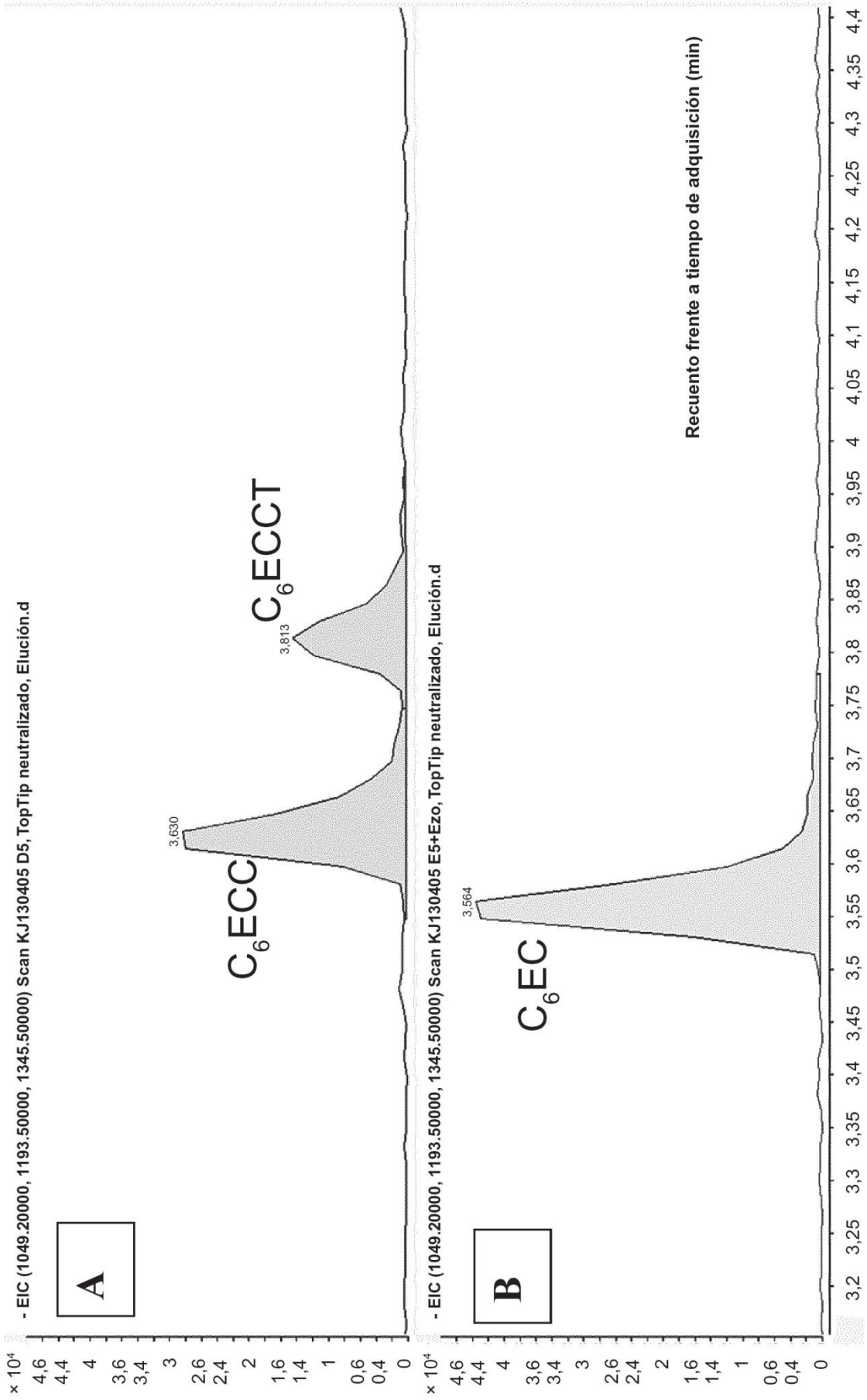


FIG. 3

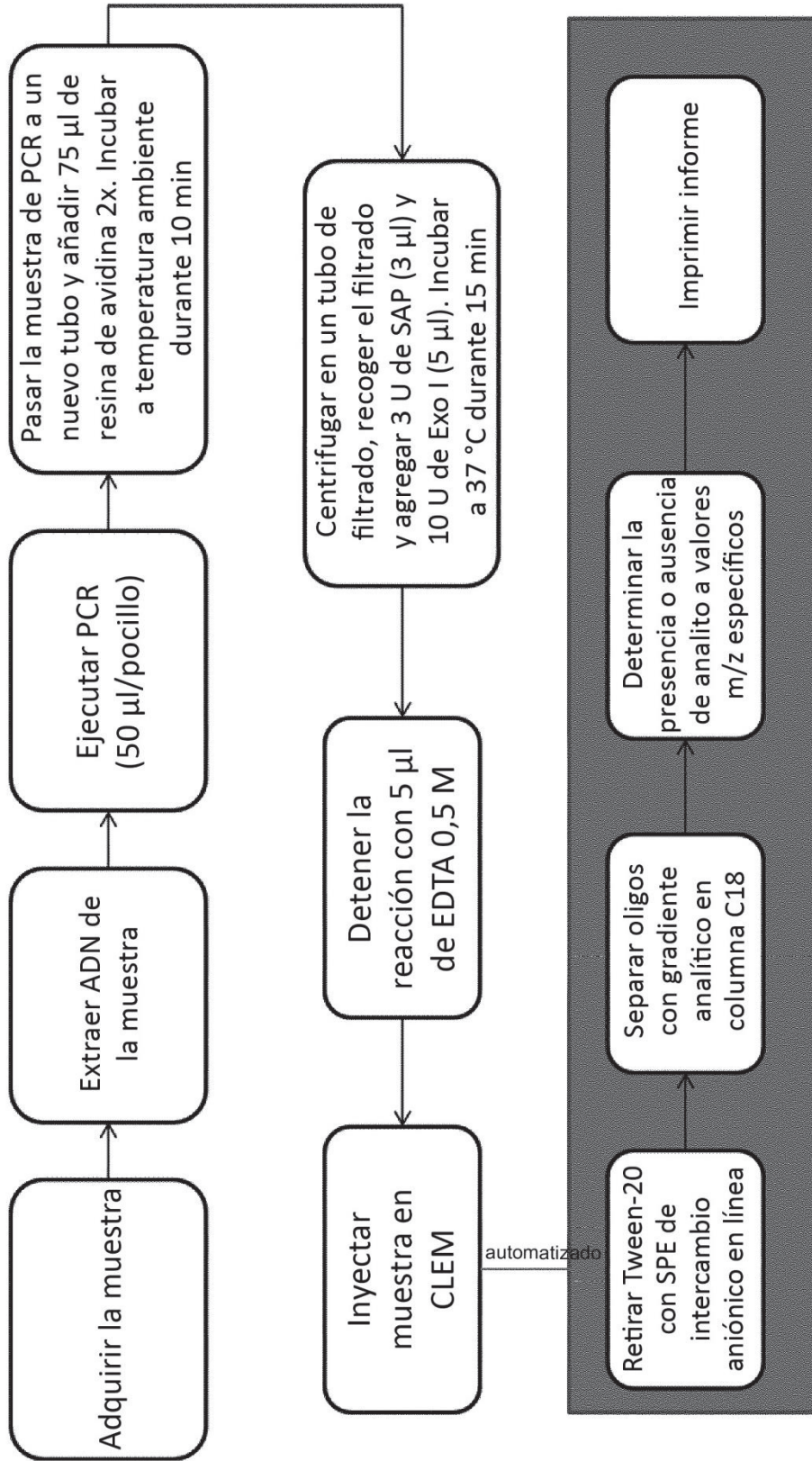
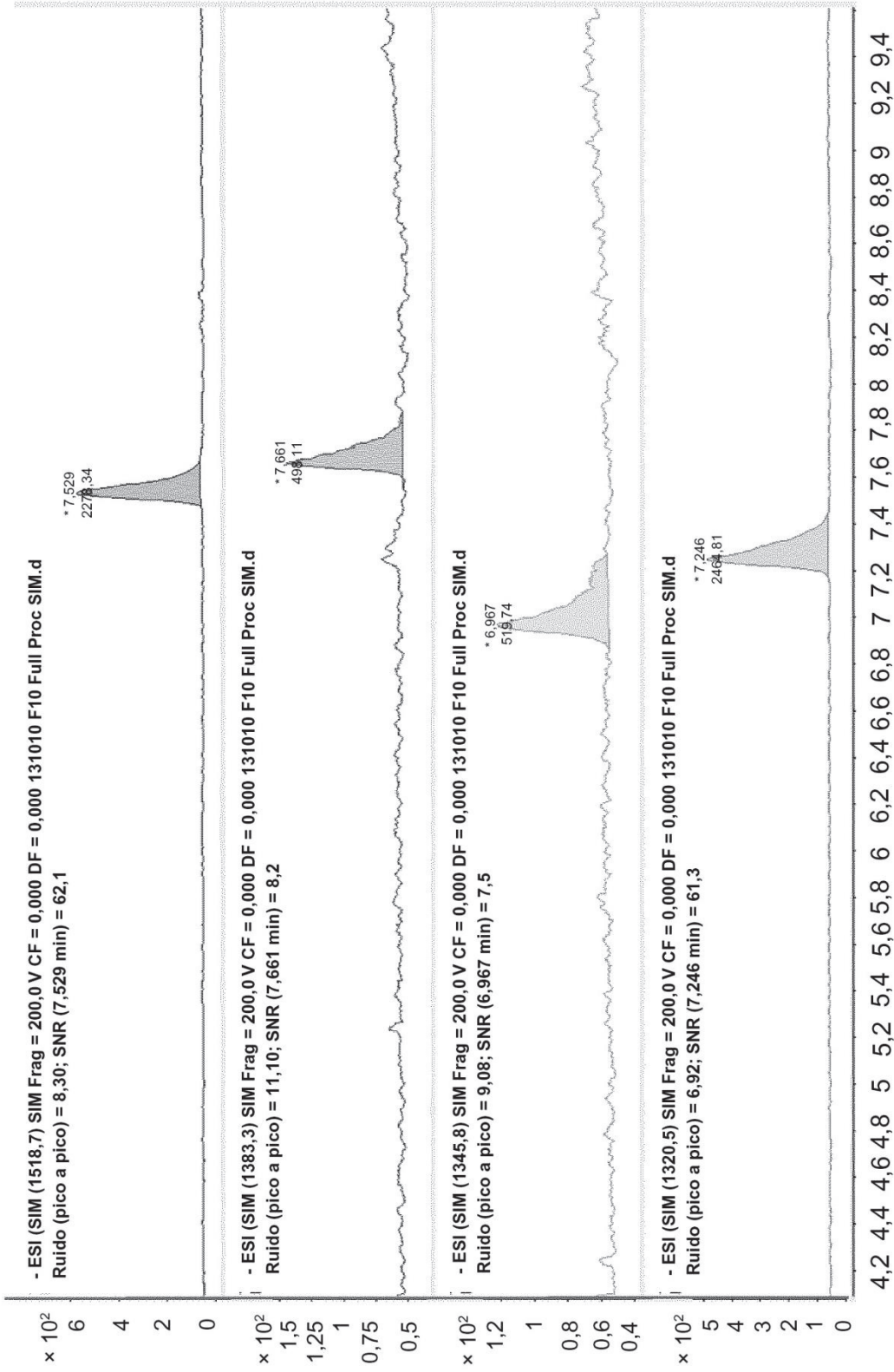


FIG. 4



Recuento frente a tiempo de adquisición (min)

FIG. 5