

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 069**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6816** (2008.01)

**C12Q 1/682** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2014** **E 20176773 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3757228**

54 Título: **Detección múltiple de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**02.12.2013 GB 201321196**

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

**13.11.2024**

73 Titular/es:

**VANADIS DIAGNOSTICS (100.0%)**  
**Vetenskapsvagen 10**  
**19138 Sollentuna, SE**

72 Inventor/es:

**DAHL, CARL y**  
**ERICSSON, JOHN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 987 069 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Detección múltiple de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

La divulgación se refiere a métodos múltiples de detección de múltiples secuencias de ácido nucleico en paralelo usando sondas que se unen a secuencias específicas. La divulgación también se refiere a la cuantificación de especies de ácido nucleico, por ejemplo, determinar las cantidades relativas de dos cromosomas diferentes en una muestra, incluido el uso de tales métodos en el diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidías fetales.

Antecedentes

Muchas enfermedades son causadas o caracterizadas por un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidía) o un desequilibrio en el número de segmentos cromosómicos (aneuploidía parcial) en las células de un individuo en comparación con el número normal de cromosomas o segmentos cromosómicos para la especie. El genoma diploide humano tiene 23 pares de cromosomas; cromosomas emparejados 1 a 22 y los cromosomas sexuales XX o XY. Los términos monosomía y trisomía se refieren a un cromosoma faltante o extra, mientras que la monosomía parcial y la trisomía parcial se refieren a un desequilibrio del material genético causado por la pérdida o ganancia, respectivamente, de parte de un cromosoma. La aneuploidía y la aneuploidía parcial en el genoma de un individuo están asociadas con trastornos congénitos como el síndrome de Down (trisomía del cromosoma humano 21) y el síndrome de Turner (monosomía o monosomía parcial del cromosoma sexual). La aneuploidía y la aneuploidía parcial también pueden surgir a través de la mutación somática en tejidos adultos. Por ejemplo, muchas células cancerosas exhiben fragilidad cromosómica que conduce a translocaciones de fragmentos cromosómicos y aneuploidía de células tumorales.

Se han desarrollado métodos para diagnosticar enfermedades asociadas con defectos cromosómicos. Los métodos tradicionales de cariotipado incluían obtener una muestra de tejido, teñir los cromosomas y examinarlos con un microscopio óptico. Schröck et al., (Science 273 (5274): 494-497, 1996) describieron el cariotipado espectral multicolor, utilizando hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para visualizar simultáneamente todos los cromosomas humanos en diferentes colores. Se elaboraron sondas marcadas con fluorescencia para cada cromosoma marcando ADN específico de cromosoma con diferentes fluoróforos. Debido a que hay un número limitado de fluoróforos espectralmente distintos, se utilizó un método de etiquetado combinatorio para generar el número requerido de espectros de emisión diferentes. Las diferencias espectrales generadas por el etiquetado combinatorio se capturaron y analizaron usando un interferómetro conectado a un microscopio de fluorescencia. Luego, el software de procesamiento de imágenes asignó un color a cada combinación espectralmente diferente, permitiendo la visualización de los cromosomas coloreados individualmente.

La hibridación genómica comparativa (CGH) implica el aislamiento de ADN de las dos fuentes a comparar, más comúnmente una fuente de prueba y referencia, el etiquetado independiente de cada muestra de ADN con fluoróforos de diferentes colores (generalmente rojo y verde), desnaturalización del ADN para que sea monocatenario, y la hibridación de las dos muestras resultantes en una relación 1:1 con una propagación normal de metafase de cromosomas, a la que las muestras de ADN marcadas se unirán en su lugar de origen. Usando un microscopio de fluorescencia y un software de ordenador, las señales fluorescentes coloreadas de forma diferencial se comparan a lo largo de cada cromosoma para identificar las diferencias cromosómicas entre las dos fuentes. Una mayor intensidad del color de la muestra de prueba en una región específica de un cromosoma indica la ganancia de material de esa región en la muestra fuente correspondiente, mientras que una mayor intensidad del color de la muestra de referencia indica la pérdida de material en la muestra de prueba en esa región específica. Un color neutro (amarillo cuando las etiquetas de fluoróforo son rojo y verde) indica que no hay diferencia entre las dos muestras en esa ubicación. CGH fue descrito por Kallioniemi et al., Science 258 (5083): 818-21, 1992 y Pinkel et al., Nat Genet. 20 (2): 207-11, 1998.

Más recientemente, se han desarrollado métodos de cariotipado digital o virtual para cuantificar el número de copias a escala genómica (Wang et al., PNAS 99 (25): 16156-16161, 2002). El cariotipado digital permite detectar diferencias en el número de copias a mayor resolución en comparación con el cariotipado convencional o el CGH basado en cromosomas. Se aíslan y enumeran secuencias cortas de ADN de loci específicos en todo el genoma. Las etiquetas de 21 pb cada una se pueden obtener de ubicaciones específicas en el genoma y generalmente contienen información suficiente para identificar de forma única los loci genómicos de los que se derivaron. Por lo tanto, las etiquetas pueden coincidir con ubicaciones cromosómicas precisas y las densidades de etiquetas pueden evaluarse sobre ventanas móviles para detectar anomalías en el contenido de la secuencia de ADN. Los métodos para hacer coincidir las etiquetas de secuencia con sus ubicaciones cromosómicas incluyen secuenciación de alto rendimiento, uso de hibridación genómica comparativa de matrices y matrices SNP.

Las matrices se componen de cientos a millones de sondas que son complementarias a una región de interés en el genoma. El ADN de la muestra de prueba se fragmenta, marca e hibrida con la matriz. Las intensidades de la señal de hibridación para cada sonda se cuantifican para cada posición en la matriz. Conociendo la dirección de cada sonda en la matriz y la dirección de cada sonda en el genoma, se utiliza un algoritmo para alinear las sondas en orden

cromosómico y reconstruir el genoma *in silico*. La resolución del cariotipado digital depende de la densidad de las sondas en la matriz.

Un área en la que se requiere un análisis de alta precisión es en el cariotipado prenatal no invasivo. Las madres embarazadas portan ADN circulante libre de células en su sangre, de las cuales 4-30% se deriva del feto. Es posible determinar el cariotipado del feto determinando la abundancia de ADN libre de material celular que se origina en cada cromosoma. Por ejemplo, si el ADN libre de material celular consiste en 95% de ADN materno y 5% de ADN fetal, y si el feto tiene una trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down), la cantidad total de ADN libre de material celular del cromosoma 21 debe exceder la de cualquier otra región genómica del mismo tamaño en un 2,5%. La observación de una aneuploidía cromosómica en el ADN fetal requiere una medición muy precisa para detectar desequilibrios tan leves en las cantidades relativas de diferentes cromosomas. La dificultad se ve agravada por la necesidad de trabajar con muestras relativamente pequeñas para proporcionar un método que sea conveniente y aceptable para pacientes y médicos.

El análisis de objetivos específicos a partir de moléculas de ADN únicas o pocas ha sido tradicionalmente un desafío técnico. Por lo general, se requieren métodos para copiar el ADN para lograr una señal suficiente para los procedimientos de análisis posteriores. Los métodos de análisis, como la secuenciación del ADN, la electroforesis en gel y las micromatrices de ADN, generalmente requieren una amplificación de la señal del ADN en la muestra proporcionada. El método de amplificación más común para amplificar objetivos de ADN específicos es la PCR, que puede proporcionar millones (o miles de millones) de copias de objetivos específicos de una muestra de ADN. Sin embargo, cuando se desea amplificar muchas regiones de una muestra genómica para análisis, pueden surgir artefactos de amplificación como resultado de realizar múltiples amplificaciones diferentes juntas en la misma mezcla de reacción. Además, una etapa de amplificación puede dar como resultado la pérdida de información con respecto a cantidades relativas de secuencias en la muestra, ya que la diferencia original en la cantidad relativa puede ser pequeña en comparación con la magnitud absoluta de los productos de ácido nucleico amplificados, y dado que diferentes secuencias pueden amplificarse con diferentes eficiencias.

Göransson et al. (Nucl Acids Res (2009) 37(1):e7) divulgan un método para cuantificar productos RCA marcados distribuidos en una superficie.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para cuantificar productos de amplificación en círculo rodante (RCA), comprendiendo el método: (a) marcar productos RCA; (b) distribuir los productos RCA marcados sobre la superficie de un sustrato, en donde cada uno de los productos RCA marcados comprende: (i) un producto RCA, (ii) un único producto de ligación circularizado, y (iii) una pluralidad de oligonucleótidos marcados que se hibridan a una secuencia que se repite en el producto RCA; y (c) contar el número de productos RCA marcados que están presentes en un área del sustrato, en donde el sustrato comprende múltiples conjuntos de productos RCA que están marcados de manera distinguible antes de distribuirse sobre el sustrato.

Algunas realizaciones del método descrito en el presente documento introducen un enfoque novedoso en el que se detecta una especie de ácido nucleico de interés (por ejemplo, un cromosoma) que contiene múltiples secuencias objetivo únicas usando múltiples sondas específicas. Se utilizan múltiples sondas para proporcionar una señal detectable, donde la magnitud de la señal es proporcional al número de sondas que reconocen sus secuencias objetivo. Las señales individuales de la pluralidad de sondas se convierten en una única señal acumulativa detectable, amplificando las señales individuales a través del sondeo múltiple. Diez o más sondas producen una amplificación de señal de diez veces o más. Las señales generadas dependen de las sondas reaccionadas correctamente tras el reconocimiento del objetivo, utilizando hibridación específica de secuencia y catálisis enzimática para generar productos específicos a partir de los cuales se obtiene la señal.

Algunas realizaciones usan la detección de múltiples loci en una molécula objetivo de especies de ácido nucleico de interés como una etapa de amplificación de señal, y por lo tanto permite la generación y detección de señal sin requerir la amplificación de los productos de las sondas reaccionadas. Sin embargo, la señal de los productos multiplex se puede amplificar opcionalmente mediante etapas tradicionales de amplificación de señal. Se puede realizar la amplificación clonal de la señal. Las técnicas de amplificación adecuadas incluyen amplificación en círculo rodante, PCR puente, emPCR y PCR digital.

Cada sonda que reconoce su secuencia objetivo genera un producto de ligadura, y los productos de ligadura producidos por cada hibridación de sonda pueden ser detectables individualmente, de modo que se puede obtener una señal individual de cada uno. Sin embargo, una característica elegante de algunas implementaciones del presente método es que estas señales individuales no necesitan ser detectadas individualmente, sino que se fusionan en una señal acumulativa y se detecta la señal acumulativa. La señal acumulativa es una combinación de las señales individuales y, por lo tanto, se puede utilizar para detectar y/o cuantificar los productos de ligadura, lo que representa la presencia o cantidad de las especies de ácido nucleico bajo investigación. Esto permite una fusión más temprana

de las señales de la sonda en comparación con los métodos que implican secuenciación y microarreglos, en los que se generan señales individuales para múltiples sondas en una región y luego la señal se fusiona en el análisis para representar una región. La señal se puede fusionar antes de la detección, de modo que las señales individuales no se mapeen o interroguen por separado. Esto permite un formato de lectura más simple.

El método de amplificación de señal mediante multiplexación puede usarse para detectar especies de ácido nucleico de interés en una muestra, por ejemplo, cuando una especie de ácido nucleico es un componente menor o traza en una muestra compleja de ácido nucleico. La amplificación por multiplexación permite una detección confiable. Esto puede usarse, por ejemplo, para detectar ácido nucleico microbiano en muestras, tales como muestras de pacientes, con fines de diagnóstico. Las muestras se pueden sondear con sondas específicas para ácidos nucleicos microbianos de múltiples especies, para detectar e identificar aquellas presentes. Esto es útil para la detección de agentes de enfermedades infecciosas, tales como bacterias, virus y hongos. Se pueden detectar transcripciones específicas de ácido nucleico. La amplificación por multiplexación también puede usarse para cuantificar las especies de ácido nucleico. Al sondear dos o más especies de ácido nucleico, una o más especies de interés y una o más especies de ácido nucleico de referencia, el presente método permite la cuantificación de las cantidades relativas de las dos especies en la muestra. El método es especialmente útil cuando se aplica a la detección o cuantificación de cromosomas o loci cromosómicos, por ejemplo, para la detección del número de copias cromosómicas. Una aplicación de valor particular es el uso de tales métodos para identificar defectos cromosómicos, incluso para el diagnóstico de cánceres y aneuploidías congénitas. El uso para el diagnóstico prenatal no invasivo (NIPT) se describe específicamente. El presente método es de uso particular cuando se interrogan/detectan ácidos nucleicos grandes que comprenden una multitud de secuencias objetivo, especialmente si estos ácidos nucleicos están presentes en una cantidad molar baja, y cuando deben medirse o cuantificarse con muy alta precisión, como es el caso en NIPT.

Se puede detectar una especie de ácido nucleico en una muestra poniendo en contacto la muestra con un conjunto de sondas, en el que cada sonda reconoce específicamente una secuencia objetivo distinta en la especie de ácido nucleico a detectar, y en el que el reconocimiento de cada secuencia objetivo por cada sonda genera un producto y detecta una señal acumulativa que es una combinación de las señales de los productos, en el que la detección de la señal indica la presencia de la especie de ácido nucleico en la muestra. Las especies de ácido nucleico pueden cuantificarse cuantificando la señal acumulativa para determinar un nivel de señal, en el que el nivel de señal es proporcional a la cantidad de especies de ácido nucleico en la muestra y, por lo tanto, determinando la cantidad de especies de ácido nucleico en la muestra. Una primera especie de ácido nucleico puede cuantificarse en relación con una segunda especie de ácido nucleico o de referencia poniendo en contacto la muestra con un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas, en el que las sondas del primer conjunto reconocen específicamente una secuencia objetivo distinta dentro de la primera especie de ácido nucleico y en el que las sondas del segundo conjunto reconocen específicamente una secuencia objetivo distinta dentro de la segunda especie de ácido nucleico o de referencia. Se detectan las señales acumulativas primera y segunda, siendo la primera señal acumulativa una combinación de señales individuales de productos generados por sondas del primer conjunto que reconoce sus secuencias objetivo, y la segunda señal acumulativa es una combinación de señales individuales de productos generados por sondas del segundo conjunto que reconocen sus secuencias objetivo. Las señales primera y segunda se cuantifican para determinar los niveles de la primera y segunda señales respectivamente, siendo proporcionales a las cantidades de la primera y segunda especie de ácido nucleico en la muestra. Las cantidades relativas de la primera y segunda especie de ácido nucleico en la muestra se pueden determinar comparando los niveles de la primera y segunda señal.

Por ejemplo, la señal acumulativa puede ser la enumeración resumida de productos amplificados y/o marcados clonalmente de las sondas que reconocen sus secuencias objetivo, por ejemplo, productos de amplificación en círculo rodante, o una señal fluorescente emitida por todos los productos en los que cada producto emite una señal fluorescente. Para cuantificar cantidades relativas de múltiples especies de ácidos nucleicos, se utilizan diferentes señales para cada especie, por ejemplo, los productos de un conjunto de sondas pueden emitir una longitud de onda o espectro de fluorescencia diferente en comparación con los productos de otro conjunto de sondas.

Se obtienen ventajas cuando el reconocimiento del objetivo de la sonda se basa tanto en la hibridación como en la discriminación enzimática, de modo que la salida de la señal depende de la reacción correcta de la sonda enzimática. Preferiblemente, el reconocimiento de la secuencia objetivo por la sonda comprende la hibridación de la sonda con la secuencia objetivo y la generación de un producto de ligadura, en el que la generación del producto de ligadura depende de la hibridación específica de la sonda con su secuencia objetivo. Las sondas que están diseñadas para ser especialmente adecuadas para su uso en el presente método se describen en el presente documento. Sin embargo, las sondas no se limitan a ningún diseño de sonda, y se pueden usar convenientemente una variedad de sondas de ácido nucleico conocidas, que incluyen, por ejemplo, sondas de candado, sondas selectoras, sondas de ligadura de oligonucleótidos, sondas de inversión molecular y sondas en tándem.

Un primer ejemplo de esta divulgación proporciona un método para detectar una especie de ácido nucleico en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de sondas, en el que cada sonda reconoce específicamente una secuencia objetivo distinta dentro de la especie de ácido nucleico a detectar, proporcionar condiciones bajo las cuales las secuencias objetivo en las especies de ácido nucleico son al menos

parcialmente monocatenarias,

proporcionar condiciones para hibridación y ligadura, bajo las cuales las sondas hibridan con sus secuencias objetivo y generan productos de ligadura, cada producto de ligadura comprende una unión de ligadura, y

detectar una señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de todos los productos de ligadura, en el que la detección de la señal indica la presencia de la especie de ácido nucleico en la muestra.

Un segundo ejemplo de esta divulgación proporciona un método que es un método para cuantificar una especie de ácido nucleico en una muestra, que comprende

poner en contacto la muestra con un conjunto de sondas, en el que cada sonda reconoce específicamente una secuencia objetivo distinta dentro de la especie de ácido nucleico que se cuantificará,

proporcionar condiciones bajo las cuales las secuencias objetivo en las especies de ácido nucleico son al menos parcialmente monocatenarias,

proporcionar condiciones para hibridación y ligadura, bajo las cuales las sondas hibridan con sus secuencias objetivo y generan productos de ligadura, cada producto de ligadura comprende una unión de ligadura, y

detectar una señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de todos los productos de ligadura, cuantificar la señal acumulativa para determinar un nivel de señal, en el que el nivel de señal es proporcional a la cantidad de especies de ácido nucleico en la muestra, y

determinar así la cantidad de especies de ácido nucleico en la muestra.

El método puede usarse para cuantificar una primera especie de ácido nucleico con respecto a una segunda especie de ácido nucleico en una muestra. Por consiguiente, el método puede comprender

poner en contacto la muestra con un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas, en el que las sondas del primer conjunto reconocen cada una específicamente una secuencia objetivo distinta dentro de la primera especie de ácido nucleico y en el que las sondas del segundo conjunto reconocen cada una específicamente una

secuencia objetivo distinta dentro de la segunda especie de ácido nucleico,

proporcionar condiciones bajo las cuales las secuencias objetivo en la primera y segunda especie de ácido nucleico son al menos parcialmente monocatenarias,

proporcionar condiciones para hibridación y ligadura, bajo las cuales las sondas hibridan con sus secuencias objetivo y generan productos de ligadura, cada producto de ligadura comprende una unión de ligadura,

detectar una primera señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de los productos de ligadura generados por sondas del primer conjunto, y cuantificarla para determinar un primer nivel de señal, en el que el primer nivel de señal es proporcional a la cantidad de la primera especie de ácido nucleico en la muestra,

detectar una segunda señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de los productos de ligadura generados por sondas del segundo conjunto y cuantificarla para determinar un segundo nivel de señal, en el que el

segundo nivel de señal es proporcional a la cantidad de la segunda especie de ácido nucleico en la muestra, y

comparar el primero y segundo niveles de la señal, determinando así las cantidades relativas de la primera y segunda especie de ácido nucleico en la muestra.

Otro ejemplo proporciona un método para cuantificar un primer cromosoma o locus cromosómico en relación con un segundo cromosoma o locus cromosómico en una muestra, que comprende

poner en contacto la muestra con un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas, en el que las sondas del primer conjunto reconocen cada una específicamente una secuencia objetivo distinta dentro del primer cromosoma o locus cromosómico y en el que las sondas del segundo conjunto reconocen cada una específicamente

una secuencia objetivo distinta dentro del segundo cromosoma o locus cromosómico,

proporcionar condiciones bajo las cuales las secuencias objetivo en el primer y segundo cromosoma o locus cromosómico son al menos parcialmente monocatenarias,

proporcionar condiciones para hibridación y ligadura, bajo las cuales las sondas hibridan con sus secuencias objetivo y generan productos de ligadura, siendo cada producto de ligadura un círculo de ácido nucleico que comprende una

unión de ligadura,

proporcionar condiciones para la replicación en círculo rodante de los círculos de ácido nucleico,

contar el número de primeros productos de replicación en círculo rodante, en los que los productos de replicación en

círculo rodante se amplifican a partir de los productos de ligadura generados por sondas del primer conjunto para proporcionar un primer recuento,

contar el número de segundos productos de replicación en círculo rodante, en los que los segundos productos de replicación en círculo rodante se amplifican a partir de los productos de ligadura generados por sondas del segundo

conjunto para proporcionar un segundo recuento, y

comparar el primer y segundo recuentos, determinando así las cantidades relativas de la primera y segunda especie de ácido nucleico en la muestra.

En estos ejemplos, los productos de amplificación en círculo rodante pueden contarse individualmente mediante: (a) la obtención de un sustrato que comprende una pluralidad de complejos distribuidos en la superficie del sustrato, en el que cada uno de los complejos comprende un único producto de RCA y una pluralidad de sondas de oligonucleótidos

marcadas que se hibridan con el producto de RCA, en el que los complejos correspondientes a los primeros productos de amplificación en círculo rodante y los complejos correspondientes a los segundos productos de amplificación en

círculo rodante están marcados de forma distintiva; y (b) contar el número de primeros productos de RCA e, independientemente, contar el número de segundos productos de RCA, que están presentes en un área del sustrato.

En este ejemplo, los oligonucleótidos pueden estar marcados en forma fluorescente.

En general, el número de sondas será al menos diez para cada especie de ácido nucleico a detectar o cuantificar. El número, por supuesto, se refiere al número de sondas diferentes, en lugar del número absoluto de moléculas de la sonda. En consecuencia, el ácido nucleico contendrá al menos diez secuencias objetivo específicas diferentes, y la señal acumulativa es una combinación de señales individuales de al menos diez sondas únicas, esta señal acumulativa representa la única especie de ácido nucleico. Se pueden usar altos niveles de multiplex para obtener niveles correspondientemente altos de amplificación de señal. Por ejemplo, se pueden usar al menos 100, al menos 1.000, al menos 10.000 o incluso números mayores de sondas para cada especie de ácido nucleico a detectar o cuantificar.

Como se indicó, una variedad de diseños de sonda son adecuados para su uso en el presente método. Las sondas que generan productos de ligadura después de la hibridación correcta a sus secuencias objetivo incluyen:

a) Sondas de candado, en las que la sonda se vuelve circular por hibridación con la secuencia objetivo, y se genera un círculo de ácido nucleico de la sonda por ligadura. Las sondas candado se describen en los documentos US 5.854.033 (Lizardi), WO99/49079 (Landegren) y US 5.871.921 (Landegren & Kwiatkowski). Una versión de la sonda de candado conocida como la sonda de inversión se describe en el documento US 6.858.412 (Willis et al.). Las sondas de inversión son sondas de candado que contienen un sitio de escisión en la cadena principal de la sonda, lo que permite que la sonda circularizada se corte para formar un producto lineal, que luego puede amplificarse y detectarse.

b) Sondas en tándem, que se vuelven circulares junto con un oligonucleótido puente al unirse a la secuencia objetivo. La plantilla de la secuencia objetivo ligan entre sí dos secuencias de sonda con un oligonucleótido puente. Las dos secuencias de la sonda se ligan para formar un círculo. Las sondas de este tipo se describen en el documento US2013/0172212 (Ariosa). Las sondas en tándem son similares a las sondas de candado pero vuelven circular la sonda en una etapa separada después de la ligadura en lugar de durante la ligadura.

c) Sondas de circularización objetivo. En sondas de este tipo, un fragmento de secuencia objetivo es circularizado por un oligonucleótido plantilla. Los extremos de la secuencia objetivo se pueden ligar juntos, opcionalmente con una secuencia intermedia entre ellos. Las sondas de circularización objetivo se describen en el documento WO2008/033442 (Stanford). El documento EP1997909 (derivado del documento WO99/49079) describe una sonda que tiene dos secuencias adyacentes complementarias a una secuencia objetivo 5' definida y una secuencia objetivo 3' definida, de modo que la hibridación del fragmento objetivo a la sonda une los extremos objetivo a la ligadura de plantilla de los extremos objetivo para circularizar el ácido nucleico objetivo.

d) Sondas selectoras, que son constructos selectores bicatenarios que tienen uno o dos extremos sobresalientes complementarios a los extremos de la secuencia objetivo, que se hibridan con la secuencia objetivo y se ligan a cada extremo de la secuencia objetivo, formando un producto de ligadura circular o lineal que contiene un ácido nucleico sonda y la secuencia objetivo. Se conoce una variedad de sondas selectoras. Los selectores se describen, por ejemplo, en los documentos WO2005/111236 (Dahl); WO2011/009941 (Olink Genomics); WO2011/067378 (Olink Genomics) y WO2008/153492 (Agilent).

e) sondas de OLA (ensayo de ligadura de oligonucleótidos). Estas sondas se han descrito para su uso en el genotipado de SNP. Cada sonda comprende un par de oligonucleótidos que se hibridan con regiones adyacentes de una secuencia objetivo, de modo que un extremo 5' de un oligonucleótido se hibrida en forma adyacente a un extremo 3' del otro nucleótido y los extremos se ligan. Las versiones de los enfoques de la sonda de OLA incluyen la polimerización de llenado de huecos secuencia arriba (ensayo Golden Gate) o el relleno de huecos mediante la ligadura de un oligonucleótido adicional entre las dos sondas de flanco (ensayo DANSR). El ensayo Golden Gate se describió en Fan, J. B. et al., Highly parallel SNP genotyping. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 68, 69-78 (2003). El ensayo DANSR se describió en A.B. Sparks, E.T. Wang, C.A. Struble et al., Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy, Prenat Diagn (2012).

En general, las sondas deseables para usar en el presente método son sondas que hibridan con la secuencia objetivo y generan un producto de ligadura, en el que la generación del producto de ligadura depende de la hibridación específica de la sonda con su secuencia objetivo. Esto incluye todos los ejemplos de sondas enumeradas anteriormente. Preferiblemente, el producto de ligadura es un producto de doble ligadura (por ejemplo, sondas selectoras y sondas en tándem). Preferiblemente, el producto de ligadura incluye la secuencia objetivo en sí misma; por ejemplo, cuando la secuencia objetivo es un fragmento de la especie de ácido nucleico, el fragmento en sí mismo se liga a la sonda y, por lo tanto, se incorpora al producto de ligadura. Esto permite verificar la secuencia objetivo mediante la secuenciación del producto. Un producto de ligadura puede ser ácido nucleico circular o lineal, pero existen ciertas ventajas con un producto circular (por ejemplo, utilizando sondas de candado, sondas selectoras o sondas de circularización objetivo) tal como la capacidad de amplificar clonalmente y detectar los productos de replicación en círculo rodante.

En algunos casos, por lo tanto, las sondas utilizadas en el presente método tendrán una o más de las características anteriores.

En este documento se describe un nuevo diseño de sonda que es ideal para uso en los métodos del presente método. Las sondas tienen una combinación especialmente deseable de características, que incluyen (en diversas realizaciones) todos los atributos anteriores. Estas nuevas sondas comprenden un oligonucleótido de direccionamiento que es más largo que el fragmento objetivo y contiene una secuencia interna

complementaria del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y el fragmento objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y

5 secuencia de la cabeza y la cola que tienen extremos 5' y 3' libres respectivamente, en las que las secuencias de la cabeza y la cola son complementarias a las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente.

10 En condiciones de hibridación y ligadura, las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanqueo, y el fragmento objetivo, si está presente, se hibrida con la secuencia complementaria del objetivo, posicionando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola. El extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' del fragmento objetivo hibridan con los nucleótidos adyacentes del oligonucleótido de direccionamiento, y el extremo 3' de la secuencia de cola y el extremo 5' del fragmento objetivo hibridan con los nucleótidos adyacentes del oligonucleótido de direccionamiento. Si el fragmento objetivo está presente, el extremo 3' del fragmento objetivo se liga al extremo 5' de la secuencia de la cabeza para formar una primera unión de ligadura, y el extremo 5' del fragmento objetivo se liga al extremo 3' de la secuencia de la cola para formar una segunda unión de ligadura, produciendo un producto de doble ligadura que comprende una cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo.

20 El producto de la doble ligadura puede ser circular o lineal, de acuerdo con el diseño específico de la sonda, que se elabora en otra parte del presente documento.

25 En este documento se proporciona un método de análisis de muestra. En ciertos ejemplos, el método comprende: a) hibridar una muestra que comprende ADN fragmentado (por ejemplo, una muestra que ha sido digerida por una enzima de restricción) con una mezcla de sonda que comprende un primer conjunto de sondas, en el que las sondas del primer conjunto de sondas hibrida con diferentes sitios (es decir, diferentes secuencias) en un primer cromosoma y forma productos circulares no covalentes que contienen uniones ligables adyacentes cuando se hibridan con fragmentos de ADN del primer cromosoma. En este contexto, el término "ligables adyacentes" pretende significar que no hay nucleótidos intermedios entre dos oligonucleótidos y que se pueden ligar entre sí utilizando una ligasa. Ejemplos de tales sondas se describen con mayor detalle más arriba y a continuación. Ejemplos de tales sondas se ilustran mediante ejemplos en las Figuras 3 y 4. A continuación, como se muestra en la Figura 2, el método comprende: b) ligar las uniones ligables adyacentes para producir una pluralidad de productos de ligadura circular covalente. Como tal, la siguiente etapa del método comprende: c) amplificar los productos de ligadura covalentemente circulares mediante amplificación en círculo rodante (RCA) para producir una pluralidad de moléculas de productos de RCA. Los productos de RCA pueden marcarse y cuantificarse, proporcionando así una estimación de la cantidad de ADN correspondiente al primer cromosoma de la muestra. Los productos circularizados proporcionan una ventaja significativa para la detección porque pueden amplificarse mediante amplificación en círculo rodante (RCA). RCA produce cientos o miles de copias de un producto circularizado en una sola molécula, lo que amplifica efectivamente el producto circularizado y hace que sea relativamente fácil detectarlos individualmente utilizando, por ejemplo, oligonucleótidos marcados que se hibridan con un motivo en el producto. La cuantificación de las señales de los productos de RCA individuales es importante porque, en muchas aplicaciones (por ejemplo, diagnóstico prenatal no invasivo mediante análisis de ADN libre de material celular), el número de fragmentos correspondientes a cromosomas particulares (por ejemplo, el cromosoma 21) debe determinarse con bastante precisión y sin prejuicios. Los métodos de análisis típicos usan PCR que, como es bien sabido, es un procedimiento muy sesgado en el sentido de que algunas secuencias se amplifican con una eficiencia mucho mayor que otras. Esto hace que las estrategias basadas en PCR sean poco prácticas para muchos esfuerzos de diagnóstico.

50 La Figura 8 ilustra cómo se pueden cuantificar los productos de amplificación en círculo rodante. En este método, la etapa de cuantificación se puede hacer separando las moléculas individuales del producto de amplificación en círculo rodante producidas en la etapa c) entre sí, y contando el número de moléculas individuales del producto de amplificación en círculo rodante en un área o volumen definido. Como se muestra en la Figura 8, los productos 22 circularizados (productos 22a, 22b, 22c y 22d circularizados compuestos) que comprenden la secuencia objetivo X y las secuencias de flanqueo A y B se amplifican mediante el cebador 52 para producir un conjunto de productos de RCA. Los productos de RCA luego se distribuyen en la superficie, y el número de productos de RCA puede contarse directamente por microscopía, en el que el término "distribución" significa que los productos de RCA se depositan en la superficie de un sustrato plano y se les permite esparcirse. Los productos de RCA no necesitan estar unidos al sustrato, pero pueden estarlo en ciertos casos (por ejemplo, a través de biotina o similares).

60 En estas realizaciones, la etapa de cuantificación puede realizarse mediante: i. hibridación de un oligonucleótido marcado con las moléculas del producto de RCA, en la que el oligonucleótido marcado hibrida con una secuencia que se repite en el producto de RCA, produciendo así una pluralidad de complejos que comprenden cada uno un solo producto de RCA y una pluralidad de oligonucleótidos marcados que se hibridan con el producto de RCA; y ii. contar el número de complejos marcados en un área definida en la superficie del sustrato. Como se muestra en la Figura 2, en el punto de detección, un producto de RCA es parte de un complejo que contiene el producto de RCA mismo, un único producto circularizado y una pluralidad de oligonucleótidos marcados que se hibridan con una secuencia que se repite en el producto de RCA.

Como se reconocería, los productos de RCA se pueden marcar antes o después de que se distribuyan en el sustrato. Como tal, en estas realizaciones, la etapa de cuantificación puede realizarse mediante: (a) la obtención de un sustrato que comprende los complejos marcados distribuidos en la superficie del sustrato; y (b) el conteo del número de productos de RCA que están presentes en la primera área del sustrato. El método puede multiplexarse para que otros productos cíclicos puedan cuantificarse al mismo tiempo. Por ejemplo, los conjuntos de sondas utilizados en el método pueden contener secuencias distinguibles (por ejemplo, las sondas del cromosoma 21 pueden contener una primera secuencia y las sondas del cromosoma 18 pueden contener una segunda secuencia), y los diferentes conjuntos de productos de RCA producidos como resultado de la circularización de esas sondas se pueden distinguir usando oligonucleótidos marcados distintivamente que hibridan con la primera y segunda secuencias.

En estas realizaciones, el método puede comprender: (a) obtener un sustrato que comprende una primera y segunda pluralidades de complejos distribuidos en la superficie del sustrato, en el que cada uno de los complejos comprende un único producto de RCA y una pluralidad de sondas de oligonucleótidos marcados que se hibridan con el producto de RCA, la primera y segunda pluralidad de complejos están marcadas de forma distintiva, y la primera y segunda pluralidad de complejos corresponden a diferentes cromosomas; y (b) contar el número de la primera pluralidad de productos de RCA e, independientemente, contar el número de la segunda pluralidad de productos de RCA, que están presentes en la primera área del sustrato. En esta realización, los oligonucleótidos pueden estar marcados de manera fluorescente. Los pares de etiquetas fluorescentes distinguibles adecuadas útiles en los métodos objetivo incluyen Cy-3 y Cy-5 (Amersham Inc., Piscataway, NJ), Quasar 570 y Quasar 670 (Biosearch Technology, Novato CA), Alexafluor555 y Alexafluor647 (Molecular Probes, Eugene, OR), BODIPY V-1002 y BODIPY V1005 (Molecular Probes, Eugene, OR), POPO-3 y TOTO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR) y POPRO3 TOPRO3 (Molecular Probes, Eugene, OR). Otras etiquetas detectables distinguibles adecuadas se pueden encontrar en Kricka et al., (Ann Clin Biochem. 39: 114-29, 2002).

En algunas realizaciones, la muestra puede contener fragmentos de ADN genómico, por ejemplo, ADN genómico de prácticamente cualquier organismo, incluyendo, entre otros, plantas, animales (por ejemplo, reptiles, mamíferos, insectos, gusanos, peces, etc.), muestras de tejido, bacterias, hongos (por ejemplo, levadura), fagos, virus, tejido cadavérico, muestras arqueológicas/antiguas, etc. En ciertas realizaciones, el ADN genómico utilizado en el método puede derivarse de un mamífero, en el que en ciertas realizaciones el mamífero es un humano. En ejemplos de realizaciones, la muestra genómica puede contener ADN genómico de una célula de mamífero, tal como una célula humana, de ratón, de rata o de mono. La muestra puede estar hecha de células cultivadas o células de una muestra clínica, por ejemplo, una biopsia de tejido, raspado o lavadura o células de una muestra forense (es decir, células de una muestra recolectada en la escena del crimen). En realizaciones particulares, la muestra de ácido nucleico puede obtenerse de una muestra biológica tal como células, tejidos, fluidos corporales y heces. Los fluidos corporales de interés incluyen, entre otros, sangre, suero, plasma, saliva, mucosa, flema, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, lágrimas, líquido del conducto lactal, linfa, esputo, fluido cerebroespinal, líquido sinovial, orina, líquido amniótico y semen. En realizaciones particulares, se puede obtener una muestra de un sujeto, por ejemplo, un humano. En algunas realizaciones, la muestra analizada puede ser una muestra de ADN libre de material celular obtenida de sangre, por ejemplo, de la sangre de una mujer embarazada. En ciertas realizaciones, el ADN genómico puede amplificarse, por ejemplo, usando un método de amplificación del genoma completo, antes de la fragmentación. La muestra puede contener ADN microbiano, por ejemplo, ADN del genoma de un virus o bacteria.

En cualquier realización, la mezcla de sondas puede comprender un segundo conjunto de sondas, en el que las sondas del segundo conjunto de sondas hibridan con diferentes sitios en un segundo cromosoma y forman productos circulares no covalentes que contienen uniones ligables adyacentes cuando se hibridan con fragmentos de ADN del segundo cromosoma. En este método, la etapa de cuantificación puede comprender cuantificar por separado el número de moléculas del producto de amplificación en círculo rodante que corresponden al primer y segundo cromosomas, proporcionando así una estimación de la cantidad relativa de ADN correspondiente al primer y segundo cromosomas en la muestra. Como se señaló anteriormente, los productos de RCA correspondientes al primer y segundo cromosomas pueden cuantificarse por separado hibridándolos con oligonucleótidos marcados de manera distintiva y distribuyéndolos en la superficie de un soporte, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio.

El método también puede usarse para examinar regiones subcromosómicas. En estas realizaciones, el primer conjunto de sondas puede hibridarse con diferentes sitios en una primera región de un cromosoma. En estas realizaciones, la mezcla de sondas puede comprender un segundo conjunto de sondas, en el que las sondas del segundo conjunto de sondas hibridan con diferentes sitios en una segunda región en el primer cromosoma y forman productos circulares no covalentes que contienen uniones ligables adyacentes cuando se hibridan con fragmentos de ADN del segundo cromosoma. En este método, la etapa de cuantificación puede comprender cuantificar por separado el número de moléculas del producto de amplificación en círculo rodante que corresponden a las regiones primera y segunda de los primeros cromosomas, proporcionando así una estimación de la cantidad relativa de ADN correspondiente a la primera y segunda regiones de un cromosoma en la muestra. Como se señaló anteriormente, los productos de RCA correspondientes al primer y segundo cromosomas pueden cuantificarse por separado hibridándolos con oligonucleótidos marcados de manera distintiva y distribuyéndolos en la superficie de un soporte, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio.



Para las realizaciones de pruebas prenatales no invasivas, el fragmento objetivo puede ser del cromosoma humano 21, 13 o 18, por ejemplo, aunque pueden examinarse otras anomalías cromosómicas (por ejemplo, otras trisomías, o eliminaciones o inserciones de una región particular). Las variaciones en el número de copias son alteraciones del ADN genómico que corresponden a regiones relativamente grandes del genoma que se han eliminado o amplificado en ciertos cromosomas. Las CNV pueden ser causadas por reordenamientos genómicos tales como eliminaciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. La variación del número de copias se ha asociado con varias formas de cáncer (Cappuzzo F, Hirsch, et al., (2005) 97 (9): 643-655), trastornos neurológicos (Sebat, J., et al., (2007) Science 316 (5823): 445-9), incluido autismo (Sebat, J., et al. (2007) Science 316 (5823): 445-9), y esquizofrenia St Clair D (2008). Schizophr Bull 35 (1): 9-12. La detección de variantes del número de copias de un cromosoma de interés o una porción del mismo en una población de células específicas puede ser una herramienta poderosa para identificar indicadores genéticos de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, el primer cromosoma es el cromosoma 21 y el segundo cromosoma se selecciona del cromosoma 13 y el cromosoma 18.

En cualquier realización, cada uno de los productos circulares de manera covalente comprende un fragmento de ADN de la muestra. En las implementaciones mostradas en las Figuras 3 y 4, las sondas utilizadas en el método pueden comprender: i. una secuencia de la cabeza y una secuencia de cola, en las que las secuencias de la cabeza y la cola están en los extremos de una primera molécula de oligonucleótido; y ii. una secuencia de cabestrillo que comprende, en orden: una secuencia de flanqueo secuencia arriba que es complementaria a la secuencia de la cabeza; una secuencia complementaria del objetivo que es complementaria a un fragmento objetivo; y una secuencia de flanqueo secuencia abajo que es complementaria a la secuencia de cola. En estas realizaciones, en los productos circulares no covalentes, los extremos del fragmento objetivo son ligables de manera adyacente a los extremos de las secuencias de la cabeza y la cola en la primera molécula de oligonucleótido. En estas realizaciones, la secuencia de cabestrillo puede estar en la primera molécula oligonucleotídica. Alternativamente, la secuencia de cabestrillo puede estar en una segunda molécula de oligonucleótido.

En algunas realizaciones, el método comprende hibridar la muestra con un conjunto de al menos 50 (por ejemplo, al menos 100, al menos 200, al menos 500, al menos 1.000, al menos 2.000 o al menos 5.000) de dichas sondas, en el que dichas sondas se dirigen a diferentes fragmentos en el mismo cromosoma (por ejemplo, el cromosoma humano 21, 13 o 18), y en el que el método da como resultado una pluralidad de productos cíclicos que comprenden los fragmentos objetivo. El número de productos cíclicos producidos puede cuantificarse, por ejemplo, amplificándolos usando RCA y contando el número de productos de RCA, como se describió anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

El experto en la materia entenderá que los dibujos, descritos a continuación, son solo para fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

La Figura 1 ilustra esquemáticamente una realización del método objetivo en el que una especie objetivo de ADN de interés se pone en contacto con múltiples sondas lineales marcadas y se detecta la señal acumulada de las etiquetas unidas.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente una realización del método objetivo en el que una especie objetivo de ADN de interés se pone en contacto con múltiples sondas de circularización que se amplifican clonalmente mediante amplificación en círculo rodante y se detecta la señal acumulativa de los productos amplificados.

La Figura 3 muestra una sonda que comprende un oligonucleótido de cadena principal circularizado unido a su fragmento objetivo. La sonda se ilustra en dos versiones, A y B.

La Figura 4 muestra una sola sonda de oligonucleótido circularizada con el fragmento objetivo unido.

La Figura 5 muestra una sonda circularizada de doble bucle compuesta de un oligonucleótido de direccionamiento y un oligonucleótido de cadena principal en bucle, con un fragmento objetivo unido.

La Figura 6 muestra una sonda en bucle lineal compuesta de un oligonucleótido de direccionamiento y un oligonucleótido de cadena principal lineal, con un fragmento objetivo unido.

La Figura 7 muestra una sonda lineal que comprende dos oligonucleótidos de la cadena principal, con un fragmento objetivo unido.

La Figura 8 muestra un método por el cual se pueden contar los productos de RCA.

La Figura 9 es una imagen de un gel que muestra la especificidad del método descrito en el presente documento.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la precisión del método descrito en el presente documento.

La Figura 11, panel A, muestra una imagen de productos de RCA marcados en la superficie de un portaobjetos; el

panel B muestra cómo se pueden determinar con precisión las proporciones de fragmentos de diferentes cromosomas contando productos de RCA individuales.

#### Descripción detallada

5

#### Reconocimiento múltiple de secuencias objetivo

La especie de ácido nucleico a detectar o cuantificar incluye múltiples secuencias objetivo. Estas secuencias objetivo son distintas entre sí. Por lo tanto, representarán ubicaciones espacialmente distintas en el ácido nucleico, aunque pueden superponerse. Las secuencias objetivo dentro de una especie dada de ácido nucleico pueden estar superpuestas, no superpuestas, o puede haber una mezcla de secuencias objetivo superpuestas y no superpuestas. Preferiblemente, las secuencias objetivo no se superponen. Efectivamente, el conjunto de secuencias objetivo para una especie de ácido nucleico representa diferentes epítomos para la detección de la misma especie de ácido nucleico.

Por lo general, habrá al menos 10, al menos 100, al menos 1.000 o al menos 10.000 secuencias objetivo distintas en el ácido nucleico, y cada una de estas puede ser sondeada.

Las concentraciones adecuadas de sondas pueden determinarse en base a la concentración (o concentración esperada) de la especie de ácido nucleico en la muestra. Como se ilustra en los Ejemplos, se pueden agregar sondas a la muestra a una concentración de 10 pM por sonda. Cuando una muestra se pone en contacto con múltiples sondas (por ejemplo, un conjunto de sondas), las concentraciones de las sondas individuales pueden ser de 10 pM. Preferiblemente, las sondas se usan en exceso de la concentración esperada de las especies de ácido nucleico de interés a detectar o cuantificar. El uso del exceso de sonda debe garantizar que se reconozcan todas las copias de las secuencias objetivo presentes en la muestra. Esto maximiza la sensibilidad de detección. Además, cuando los métodos implican la cuantificación, asegura que la detección de los productos de ligadura o la señal acumulativa de un conjunto de sondas sea proporcional a la cantidad de secuencias objetivo en la muestra.

Cuando una especie de ácido nucleico debe cuantificarse en relación con otra, las secuencias objetivo son específicas para la especie de ácido nucleico, es decir, no se encuentran en las otras especies de ácido nucleico, y preferiblemente no se encuentran en ninguna otra especie de ácido nucleico que pueda estar en la muestra.

Para muchas aplicaciones de diagnóstico y otras, la especie de ácido nucleico es un cromosoma o un locus cromosómico, por ejemplo, un cromosoma humano o un locus cromosómico. Por lo tanto, cada fragmento de secuencia objetivo puede ser específico para ese cromosoma del genoma de un organismo. En otras palabras, se puede encontrar solo en un cromosoma del genoma y no en otros cromosomas de ese genoma. Comúnmente, el presente método se usará para el análisis del genoma humano, en cuyo caso la secuencia objetivo puede ser un fragmento específico de un cromosoma humano, es decir, se encuentra en ese cromosoma y no en otros cromosomas humanos. Por ejemplo, las secuencias objetivo pueden ser específicas del cromosoma 21. Las secuencias objetivo pueden ser específicas de un locus de un cromosoma. En consecuencia, se pueden encontrar en ese locus cromosómico y no en otros loci del mismo cromosoma u otros cromosomas del mismo genoma. Por ejemplo, las secuencias objetivo pueden ser específicas de un locus de un cromosoma humano.

Una especie dada de ácido nucleico en una muestra puede abarcar cierta variabilidad, por ejemplo, una muestra puede comprender cromosomas de diferentes individuos, tales como ácido nucleico obtenido de sangre materna que contiene ADN materno y ADN fetal. Aquí la especie de interés puede ser un cromosoma particular, pero es conveniente detectar todas las copias de ese cromosoma, ya sea de origen fetal o materno. Por lo tanto, una especie de interés puede ser un cromosoma o un locus cromosómico, y las secuencias objetivo se encuentran en ese cromosoma o locus en copias maternas y fetales del cromosoma o locus cromosómico.

Las especies de ácido nucleico pueden estar fragmentadas. Las secuencias objetivo pueden ser secuencias de fragmentos de la especie de ácido nucleico, es decir, fragmentos objetivo.

Preferiblemente, las secuencias objetivo son fragmentos cuya secuencia está predefinida. Se puede conocer la secuencia de todo el fragmento, incluidos los extremos. Los fragmentos conocidos de la secuencia predefinida se pueden producir mediante fragmentación específica, en lugar de aleatoria, de la especie de ácido nucleico. Los métodos de fragmentación específicos incluyen la digestión con enzimas de restricción, PCR (por ejemplo, PCR múltiple) y otros métodos de definición del extremo del fragmento dirigido a la secuencia, que incluyen otras enzimas, ribozimas o una combinación de tales técnicas.

Un método preferido de fragmentación es la digestión con una endonucleasa de restricción o una combinación de dos o más endonucleasas de restricción. Por lo tanto, la muestra puede ser una digestión con enzimas de restricción de ácido nucleico y las secuencias objetivo pueden ser fragmentos de restricción.

Se conocen una variedad de enzimas de escisión de ácido nucleico específicas y se puede usar cualquier enzima adecuada en el presente método, incluyendo enzimas que se escinden en una posición predefinida dentro de una secuencia de ácido nucleico específica, o enzimas endonucleolíticas que se escinden después o antes de una

secuencia de reconocimiento de ácido nucleico específica y enzimas de corte (enzimas de corte lateral). Los ácidos nucleicos catalíticos, como las ribozimas, también pueden usarse para la fragmentación del ADN. Las enzimas pueden escindir el ácido nucleico bicatenario para producir un extremo romo o un extremo pegajoso, o pueden escindir un ácido nucleico monocatenario. Se conocen varios tipos de enzimas de restricción, que incluyen Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV y Tipo V. Las enzimas o combinaciones de enzimas adecuadas se pueden seleccionar para usar en el presente método según se desee. Por ejemplo, el ácido nucleico en una muestra (por ejemplo, 10 ng de ADN) puede digerirse con la enzima de restricción (por ejemplo, 1 U) en el correspondiente tampón de enzima de restricción compatible. La reacción se puede incubar en condiciones adecuadas (por ejemplo, 37 °C durante 1 hora), seguido de desactivación enzimática (por ejemplo, a 80 °C durante 20 minutos).

Otro método conveniente para proporcionar ácido nucleico fragmentado es usar cebadores para la amplificación de secuencias lineales específicas de la especie de ácido nucleico. Se puede usar PCR múltiple, tratando el ácido nucleico con múltiples pares de cebadores específicos para amplificar múltiples fragmentos específicos. En este caso, los extremos de las secuencias objetivo corresponden a las secuencias del par de cebadores.

Las muestras de ácido nucleico pueden proporcionarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, como muestras de tejido biológico o fluido de pacientes. Las muestras pueden ser muestras de sangre, sangre completa, plasma o suero, muestras de tejido, por ejemplo, muestras de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina, o pueden ser muestras de ácido nucleico extraídas de sangre o tejido.

La muestra puede ser cualquier muestra que contenga ácido nucleico. El ácido nucleico contenido en la muestra puede ser ADN y/o ARN. La muestra puede ser compleja, por ejemplo, ADN genómico completo o ADNc de un organismo completo, tejido o población de células, o una fracción de los mismos. A este respecto, puede ser, por ejemplo, un producto directo de un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico, o de un procedimiento de lisis celular, o puede fraccionarse o purificarse de alguna manera, por ejemplo, puede contener ácidos nucleicos que han sido parcial o totalmente separados de alguna manera, o tratados de alguna manera, por ejemplo, ARN para producir ADNc. La muestra puede ser de cualquier fuente eucariota, procariota o viral, por ejemplo, puede ser microbiana (por ejemplo, bacteriana o fúngica), vegetal o animal. Por lo tanto, por ejemplo, la especie de ácido nucleico a detectar o cuantificar puede ser ADN microbiano. Preferiblemente, la muestra es de origen humano, por ejemplo, ADN genómico humano. La muestra puede ser una muestra de tejido o sangre de un animal, en la que el ácido nucleico a detectar es microbiano, por ejemplo, bacteriano, viral o fúngico. Para muchas aplicaciones de diagnóstico y otras, la muestra es una muestra de cromosomas fragmentados (por ejemplo, cromosomas humanos o cromosomas microbianos). Para los métodos relacionados con el diagnóstico prenatal no invasivo, la muestra se deriva de la sangre de una mujer embarazada y comprende ADN fetal. En otros ejemplos, el ácido nucleico a detectar o cuantificar es el ADN asociado a un tumor.

Una especie dada de ácido nucleico en una muestra puede abarcar cierta variabilidad, por ejemplo, una muestra puede comprender cromosomas de diferentes individuos, tales como ácido nucleico obtenido de sangre materna que contiene ADN materno y ADN fetal. Aquí la especie de interés puede ser un cromosoma particular, pero es conveniente detectar todas las copias de ese cromosoma, ya sea de origen fetal o materno. Por lo tanto, una especie de interés puede ser un cromosoma o un locus cromosómico, y los fragmentos objetivo se obtienen de ese cromosoma o locus en copias maternas y fetales del cromosoma o locus cromosómico.

El presente método puede realizarse en las muestras *in vitro*. Por consiguiente, los métodos generalmente no incluyen el diagnóstico realizado *in vivo* en el cuerpo humano o de animal o los métodos de tratamiento del cuerpo humano o de animal mediante cirugía o terapia. Sin embargo, los resultados de los métodos de diagnóstico *in vitro* pueden usarse para informar el tratamiento posterior de los pacientes.

Desnaturalización el ácido nucleico objetivo

La sonda reconoce y se une a la secuencia objetivo en forma al menos parcialmente monocatenaria, mediante hibridación. Para algunos diseños de sonda, la secuencia objetivo debe ser completamente monocatenaria, particularmente aquellos que hibridan con la longitud total de la secuencia objetivo. Para otras sondas, por ejemplo, aquellas que hibridan solo con regiones de la secuencia objetivo, solo se requiere ácido nucleico objetivo monocatenario. Por consiguiente, se deben proporcionar condiciones adecuadas para exponer el sitio de unión de la secuencia objetivo a la sonda, dependiendo del tipo de sonda empleada.

Si la secuencia objetivo en la muestra ya no es monocatenaria o al menos parcialmente monocatenaria, se deben proporcionar condiciones para separar la secuencia objetivo monocatenaria de su cadena complementaria de ácido nucleico. Dichas condiciones pueden ser condiciones desnaturalizantes o, en algunos casos, tratamiento con exonucleasa.

Las condiciones de desnaturalización pueden ser una temperatura suficientemente alta para separar la secuencia objetivo de su secuencia complementaria. Las condiciones de desnaturalización pueden ser de incubación a 95 °C durante un tiempo adecuado, por ejemplo, 10 minutos. Alternativamente, se puede realizar la desnaturalización química.

## Complementariedad e hibridación

La unión específica entre la sonda y su secuencia objetivo es una característica importante de los métodos del presente método. Una sonda comprende preferiblemente una secuencia complementaria de un solo objetivo que reconoce la secuencia objetivo. Sin embargo, como lo ilustran las sondas de candado y las sondas selectoras, por ejemplo, las sondas pueden comprender múltiples secuencias complementarias a diferentes regiones de una secuencia objetivo.

La especificidad máxima para la secuencia objetivo se logra si la sonda comprende una secuencia complementaria del objetivo que es el complemento exacto de la secuencia objetivo o región de la secuencia objetivo, de modo que haya una hibridación perfecta entre la sonda y la secuencia objetivo. Sin embargo, esto no es esencial en todos los casos, y puede aceptarse un pequeño grado de falta de coincidencia, por ejemplo, para permitir la detección de secuencias que exhiben variación alélica en la que se desea detectar la secuencia objetivo independientemente del alelo exacto presente en la muestra. Alternativamente, se pueden diseñar múltiples sondas para variantes de secuencias. Esto puede permitir tanto la detección como la discriminación de diferentes alelos o mutaciones. Se prevé que la mayoría de las sondas tendrán una complementariedad perfecta para sus secuencias objetivo, pero algunas sondas pueden unirse a objetivos con desajustes menores.

En algunas realizaciones, las sondas usadas en el presente método comprenden cada una, una secuencia complementaria del objetivo que tiene menos de 5 pares de bases no coincidentes con la secuencia objetivo o región de secuencia objetivo. Opcionalmente, puede haber uno, dos, tres o cuatro pares de bases no coincidentes entre la secuencia o región objetivo y la secuencia complementaria del objetivo. Una falta de coincidencia puede ser un punto en el que una base correspondiente está ausente de una secuencia, de modo que la secuencia complementaria forma un bucle en el punto no coincidente, o puede ocurrir cuando un nucleótido no complementario está presente en una secuencia y, por lo tanto, no se empareja con la base en la posición correspondiente de la otra secuencia. Cuando hay un emparejamiento de bases incorrecto, es decir, un emparejamiento de A o T con C o G, el enlace de hidrógeno no tiene lugar entre las bases de las dos cadenas, aunque la hibridación seguirá teniendo lugar entre la secuencia objetivo y la secuencia complementaria del objetivo del oligonucleótido de direccionamiento debido al emparejamiento de bases entre los nucleótidos adyacentes a la falta de coincidencia. Las faltas de coincidencia pueden ser bases oscilantes. Una base oscilante normalmente correspondería a una posición en la secuencia complementaria del objetivo que se empareja con una posición de variación genética conocida en el fragmento objetivo. La sonda se puede sintetizar añadiendo uno o varios dideoxinucleótidos durante el ciclo de síntesis específico para la posición de la base oscilante. Este es típicamente el caso de la síntesis tradicional de oligonucleótidos. Alternativamente, se pueden producir múltiples sondas separadas, una para cada variante genética. Este suele ser el caso si las sondas se sintetizan utilizando síntesis basada en microarreglos. Una base oscilante puede corresponder a diferencias de un solo nucleótido entre codones, en la que los diferentes codones codifican el mismo aminoácido.

En general, las secuencias complementarias objetivo más largas para hibridar secuencias objetivo más largas o regiones de las mismas pueden tolerar un mayor número de faltas de coincidencia en comparación con secuencias complementarias objetivo más cortas. La secuencia complementaria del objetivo puede, por ejemplo, tener como máximo 1 en 8, 1 en 9 o 1 en 10 faltas de coincidencia de pares de bases con la secuencia objetivo o la región de la misma. Cualquiera de estas faltas de coincidencia debe restringirse a la región interna de la secuencia complementaria del objetivo y la secuencia o región objetivo, de modo que no inhiban la ligadura o la fragmentación objetivo específica de la secuencia, por ejemplo, digestión con enzimas de restricción. Por consiguiente, preferiblemente existe una complementariedad perfecta entre la secuencia objetivo y la secuencia complementaria del objetivo en los 6 a 8 nucleótidos terminales, preferiblemente los 10 nucleótidos terminales en cada extremo de la secuencia objetivo.

Preferiblemente, una sonda comprende una secuencia complementaria del objetivo única que tiene la misma longitud que la secuencia objetivo. La longitud completa de la secuencia objetivo está unida por la secuencia complementaria del objetivo. La hibridación de la secuencia objetivo al oligonucleótido de direccionamiento representa un evento de unión único entre las dos moléculas de ácido nucleico, en contraste con las sondas que unen los dos extremos de una molécula objetivo o dos regiones no adyacentes de la objetivo.

La secuencia complementaria del objetivo puede tener una longitud de al menos 10 nucleótidos, por ejemplo al menos 15 nucleótidos. Puede tener hasta 20, 25, 30, 35 o 40 nucleótidos de largo. Los intervalos preferidos incluyen 10-20 nucleótidos, 10-30 nucleótidos y 10-40 nucleótidos. Dichas secuencias complementarias objetivo relativamente cortas son adecuadas para unir secuencias objetivo correspondientemente cortas. La secuencia corta contribuye a la especificidad de la reacción de doble ligadura, ya que la ADN ligasa es sensible a los emparejamientos erróneos de pares de bases y ligará preferiblemente secuencias perfectamente emparejadas. Cuando hay faltas de coincidencia presentes en la huella de la ADN ligasa unida a la secuencia bicatenaria, las secuencias pueden no estar ligadas, lo que proporciona una etapa de corrección adicional que garantiza una alta especificidad en la detección de la secuencia objetivo con preferencia a secuencias de diferente secuencia pero similar. La ADN ligasa típicamente tiene una huella de 6 a 8 bases en cada lado del corte. Por lo tanto, si la secuencia objetivo es de 20 bases, 12 a 16 de las bases estarán cubiertas por la especificidad de la ligasa.

La hibridación de la sonda discriminará contra las faltas de coincidencia, especialmente en la parte central de la

secuencia hibridada, mientras que la ligadura discriminará contra las faltas de coincidencia en los extremos del objetivo. Juntos, esto genera una detección altamente específica.

Como se describe con más detalle en otra parte del presente documento, una sonda comprende preferiblemente:

un oligonucleótido de direccionamiento que es más largo que la secuencia objetivo y contiene una secuencia complementaria interna del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y la secuencia objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y secuencia de la cabeza y la cola que tienen extremos 5' y 3' libres respectivamente, en los que las secuencias de la cabeza y la cola son complementarias a las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente.

Estas sondas son particularmente adecuadas para su uso cuando la especie de ácido nucleico está fragmentada y las secuencias objetivo son fragmentos de secuencia definida. El oligonucleótido de direccionamiento es más largo que la secuencia objetivo, ya que incluye las secuencias de flanco así como la secuencia complementaria del objetivo. La región de flanco secuencia arriba está secuencia arriba de o 5' de la secuencia complementaria del objetivo en el oligonucleótido de direccionamiento. La región de flanco secuencia abajo está secuencia abajo de o 3' de la secuencia complementaria del objetivo en el oligonucleótido de direccionamiento. Por consiguiente, la secuencia complementaria del objetivo es interna al oligonucleótido de direccionamiento y no incluye un extremo del oligonucleótido de direccionamiento, ya que está flanqueada por las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo.

La secuencia bicatenaria producida por hibridación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria del objetivo puede considerarse una secuencia híbrida bicatenaria, ya que es un híbrido del objetivo y la sonda. Típicamente, la secuencia bicatenaria adopta una conformación helicoidal doble, en la que la secuencia objetivo es una cadena y el oligonucleótido de direccionamiento es la otra cadena de la doble hélice. La secuencia híbrida bicatenaria está flanqueada por las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, que a su vez se hibridan con las secuencias de la cabeza y la cola para producir secuencias bicatenarias. Nuevamente, estas adoptan típicamente la conformación helicoidal doble normal del ácido nucleico bicatenario.

Las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo son preferiblemente diferentes entre sí, es decir, preferiblemente tienen secuencias diferentes. Se prefiere que la secuencia de la cabeza sea complementaria a la secuencia de flanco secuencia arriba pero no a la secuencia de flanco secuencia abajo, y que la secuencia de cola sea complementaria a la secuencia de flanco secuencia abajo pero no a la secuencia de flanco secuencia arriba. Esto asegura que las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan solo con las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente.

La secuencia de la cabeza generalmente tendrá la misma longitud que la secuencia de flanco secuencia arriba. La secuencia de la cola generalmente tendrá la misma longitud que la secuencia de flanco secuencia abajo.

Las longitudes normales para las secuencias de flanco están entre 10 y 40 nucleótidos, por ejemplo 10-20 o 10-30 nucleótidos. Las secuencias de flanco pueden tener la misma longitud entre sí. Una o ambas secuencias de flanco pueden tener la misma longitud que la secuencia complementaria del objetivo. La secuencia de flanco secuencia arriba y/o secuencia abajo puede tener una longitud de al menos 10 nucleótidos, por ejemplo al menos 15 nucleótidos. Puede tener hasta 20, 25, 30, 35 o 40 nucleótidos de largo.

Preferiblemente, la secuencia de la cabeza es el complemento de la secuencia, secuencia arriba. Preferiblemente, la secuencia de la cola es el complemento de la secuencia, secuencia abajo. La coincidencia perfecta de las secuencias es deseable para la unión óptima de la sonda de modo que las secuencias de la cabeza y la cola estén posicionadas correctamente para ligadura a la secuencia objetivo. Opcionalmente, sin embargo, puede haber uno, dos, tres o cuatro faltas de coincidencia de pares de bases entre la secuencia de la cabeza y la secuencia de flanco secuencia arriba, y/o entre la secuencia de la cola y la secuencia de flanco secuencia abajo. Preferiblemente, hay menos de 5 faltas de coincidencia de pares de bases.

Además de la secuencia complementaria del objetivo, las sondas generalmente no deberían ser complementarias a la secuencia objetivo o a los otros ácidos nucleicos que pueden estar presentes en la muestra. Esto es para evitar la hibridación no deseada de la sonda a un ácido nucleico que no sea el objetivo. Por lo tanto, si la sonda es para unir una secuencia de ADN genómico humano, la sonda puede diseñarse de modo que las secuencias que no sean la secuencia complementaria del objetivo no sean complementarias al ADN genómico humano, de modo que la sonda solo hibrida con la secuencia objetivo y no con otro ácido nucleico en la muestra.

Las sondas pueden incluir una o más secuencias personalizadas. Una secuencia personalizada no es complementaria a otras regiones de la sonda o de la secuencia objetivo; en otras palabras, no se hibrida con otras regiones de la sonda (fuera de la secuencia personalizada) o con la secuencia objetivo en condiciones de hibridación. Las secuencias

personalizadas pueden usarse para la detección, por ejemplo, como códigos de barras o etiquetas para identificar sondas que pertenecen a un conjunto, como se describe en otra parte del presente documento.

#### Generación de productos de ligadura

En condiciones de hibridación y ligadura, las sondas hibridan con sus secuencias objetivo y se ligan para generar productos de ligadura. La hibridación de cada sonda da como resultado la generación de un producto de ligadura. En consecuencia, la generación del producto de ligadura depende de la hibridación específica de la sonda con su secuencia objetivo.

El producto de ligadura puede comprender o consistir en una sonda de ácido nucleico o ácido nucleico objetivo, o puede comprender tanto la sonda como el ácido nucleico objetivo. El producto de ligadura comprende una unión de ligadura que se forma por la ligadura de un extremo 5' de ácido nucleico a un extremo 3' de ácido nucleico. Cuando se ligan múltiples ácidos nucleicos, puede haber dos uniones de ligadura.

El tipo de producto de ligadura que se forma depende del tipo de sonda utilizada. Los productos de ligadura pueden ser círculos de ácido nucleico o pueden ser moléculas lineales de ácido nucleico.

Un ejemplo de una sonda que forma un producto de ligadura circular es la sonda de candado. Se conocen varios tipos de sonda de candado, por ejemplo, estándar, de relleno de huecos, sondas de inversión molecular (MIP). Las sondas de candado son oligonucleótidos lineales con secuencias complementarias objetivo en los extremos y una secuencia complementaria no objetivo en el medio. Bajo las condiciones de hibridación y ligadura, las secuencias complementarias objetivo se unen cabeza con cola para hibridarse con regiones adyacentes de la secuencia objetivo y se ligan formando un círculo de ácido nucleico. Por lo tanto, la sonda forma un círculo por hibridación con la secuencia objetivo, y el producto de ligadura es un círculo de ácido nucleico de la sonda. El producto de ligadura circular típicamente contiene una unión de ligadura en la que los extremos 5' y 3' de la sonda lineal están ligados entre sí. Se conocen variaciones que incluyen oligonucleótidos puente y sondas de relleno de huecos. Las sondas pueden contener un sitio de escisión en la cadena principal de la sonda, lo que permite que el producto de ligadura circularizado se escinda para formar un producto lineal, que luego puede amplificarse y detectarse (MIP).

Preferiblemente, la hibridación de la sonda con la secuencia objetivo coloca un oligonucleótido de la sonda para ligadura con la secuencia objetivo. En consecuencia, la secuencia objetivo puede incorporarse al producto de ligadura. Esta es una ventaja sobre las sondas, tales como las sondas de candado, ya que permite verificar las secuencias objetivo mediante la secuenciación de los productos de ligadura. Preferiblemente, la sonda se liga a cada extremo de su secuencia objetivo, formando una unión de ligadura en cada extremo de la secuencia objetivo. En tales métodos, las especies de ácido nucleico que se detecta o cuantifica preferiblemente se fragmentarán para producir fragmentos objetivo correspondientes a las secuencias objetivo. Los extremos del fragmento objetivo se pueden luego ligarse a los extremos de la sonda, capturando la secuencia objetivo dentro del producto de ligadura. En tales casos, el fragmento objetivo se liga en una reacción altamente específica con ambos extremos. Dado que el fragmento objetivo es típicamente el producto de una fragmentación específica de ácido nucleico, estos extremos generalmente tendrán una secuencia específica predeterminada. En la etapa de ligadura, estos extremos se detectan específicamente mediante ligadura dependiente de la secuencia a las secuencias de la cabeza y la cola, respectivamente. Preferiblemente, la unión del fragmento objetivo con la sonda crea dos uniones ligables perfectamente coincidentes, una entre el extremo 3' del fragmento objetivo y el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y otra entre el extremo 5' del fragmento objetivo y el extremo 3' de la secuencia de la cola.

La ligadura de un extremo 5' de ácido nucleico con un extremo 3' de ácido nucleico puede ocurrir cuando los dos extremos están emparejados con bases con nucleótidos adyacentes de una secuencia complementaria. El emparejamiento de bases de los nucleótidos del extremo respectivo con los nucleótidos adyacentes forma una cadena de ácido nucleico que contiene un corte entre los dos extremos. La ligadura de los dos extremos puede ser catalizada por la ADN ligasa. Por lo tanto, proporcionar condiciones para la ligadura generalmente comprenderá proporcionar una enzima ADN ligasa y condiciones de reacción bajo las cuales la ADN ligasa liga los dos extremos para formar una cadena continua de ácido nucleico, cerrando el corte. Hay varias enzimas ligasas disponibles comercialmente, tales como Ampligasa (Epicentre), para las cuales las condiciones adecuadas son agregar 1 U de enzima e incubar a 55 °C durante 1 hora en tampón de ligasa.

Un ejemplo de una sonda que genera un producto de ligadura que incorpora la secuencia objetivo es la sonda selectora. Estas sondas son constructos selectoras de doble cadena que tienen uno o dos extremos sobresalientes complementarios a los extremos de la secuencia objetivo, que se hibridan con la secuencia objetivo y se ligan a cada extremo de la secuencia objetivo, formando un producto de ligadura circular o lineal que contiene una sonda de ácido nucleico y la secuencia objetivo. Bajo las condiciones de hibridación y ligadura, las secuencias de los extremos de los selectores hibridan con las secuencias de los extremos de los fragmentos y se ligan con los selectores. Cuando una sonda comprende un par de constructos selectoras, que tiene cada uno un extremo sobresaliente, cada una puede estar ligado a un extremo de un fragmento objetivo, de modo que el producto de ligadura es un ácido nucleico lineal que comprende la secuencia objetivo entre dos secuencias de sonda. Cuando una sonda comprende un constructo de selector único que tiene dos extremos sobresalientes, se puede ligar en cada extremo del fragmento objetivo para

que el producto de ligadura sea un ácido nucleico circular que comprende la secuencia objetivo y el ácido nucleico de la sonda. En ambos casos, el producto de ligadura incluye dos uniones de ligadura.

Se describen numerosos otros ejemplos de sondas adecuadas en otra parte del presente documento.

En algunas realizaciones, el presente método puede usar sondas que comprenden:

un oligonucleótido de direccionamiento que es más largo que el fragmento objetivo y contiene una secuencia interna complementaria del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y el fragmento objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y las secuencias de la cabeza y la cola que tienen extremos 5' y 3' libres respectivamente, en las que las secuencias de la cabeza y la cola son complementarias a las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente, en las que bajo las condiciones de hibridación y ligadura, las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanqueo, y el fragmento objetivo, si está presente, se hibrida con la secuencia complementaria del objetivo, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola, en la que el extremo 3' del fragmento objetivo se liga al extremo 5' de la secuencia de la cabeza para formar una primera unión de ligadura, y el extremo 5' del fragmento objetivo se liga al extremo 3' de la secuencia de la cola para formar una segunda unión de ligadura, produciendo un producto de doble ligadura que comprende una cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo.

En estas sondas, las plantillas de oligonucleótidos objetivo moldean el fragmento objetivo para ligadura con las secuencias de la cabeza y la cola, debido a la ubicación de la secuencia complementaria del objetivo entre las secuencias de flanqueo. En condiciones de hibridación en presencia del fragmento objetivo, las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanqueo, definiendo un espacio entre el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola. El fragmento objetivo hibrida con la secuencia complementaria del objetivo en el hueco. Por lo tanto, la hibridación de las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo con el oligonucleótido de direccionamiento coloca el extremo 3' del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza, y coloca el extremo 5' del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 3' de la secuencia de la cola.

La colocación de dos extremos en yuxtaposición proporciona un sustrato para la ADN ligasa para ligar los extremos entre sí. Es preferible que el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' del fragmento objetivo hibriden con nucleótidos adyacentes del oligonucleótido de direccionamiento, y el extremo 3' de la secuencia de la cola y el extremo 5' del fragmento objetivo hibriden con nucleótidos adyacentes del oligonucleótido de direccionamiento. En consecuencia, la secuencia de flanqueo secuencia arriba puede estar inmediatamente adyacente a la secuencia complementaria del objetivo, sin nucleótidos intermedios. De manera similar, la secuencia de flanqueo secuencia abajo puede estar inmediatamente adyacente a la secuencia complementaria del objetivo, sin nucleótidos intermedios. Los extremos adyacentes 3' y 5' se pueden ligar directamente mediante ADN ligasa sellando el corte entre ellos para formar una cadena continua de ácido nucleico.

El producto de la doble ligadura, es decir, el producto de ligar tanto la secuencia de la cabeza como la secuencia de la cola al fragmento objetivo, es una cadena continua de ácido nucleico. Es continua en el sentido de que no contiene cortes ni huecos, por lo que todos los nucleótidos en la cadena están unidos covalentemente.

La sonda puede diseñarse de modo que la cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo sea un círculo de ácido nucleico. El término círculo en el presente documento se refiere a que la topología de la cadena es un circuito cerrado, sin extremo libre.

En condiciones de hibridación en presencia del fragmento objetivo, las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanqueo, definiendo un hueco entre el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola. El fragmento objetivo hibrida con la secuencia complementaria del objetivo en el hueco, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de las secuencias de la cola, y completando un círculo de ácido nucleico que comprende el fragmento objetivo y las secuencias de la cabeza y la cola.

Las moléculas de ácido nucleico que forman el círculo tienen sus extremos en yuxtaposición. La ligadura de los extremos produce la cadena circular continua de ácido nucleico que comprende al menos las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo.

Las sondas que forman un círculo de ácido nucleico incluyen sondas en las que las secuencias de la cabeza y la cola se proporcionan en una sola molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, además del oligonucleótido de direccionamiento, la sonda puede comprender un oligonucleótido de cadena principal que tiene las secuencias de la cabeza y la cola en sus extremos 5' y 3', respectivamente, en la que las secuencias de la cabeza y la cola del oligonucleótido de la cadena

principal se unen en forma trans con las secuencias de flanqueo del oligonucleótido de direccionamiento bajo las condiciones de hibridación. El oligonucleótido de la cadena principal puede comprender una secuencia personalizada entre las secuencias de la cabeza y la cola. La Figura 3 ilustra realizaciones de tales sondas. Alternativamente, las secuencias de la cabeza y la cola del oligonucleótido de la cadena principal pueden ser adyacentes, sin una secuencia personalizada entre ellas.

En otro ejemplo, las secuencias de la cabeza y la cola pueden estar en los extremos del oligonucleótido de direccionamiento y unirse en forma cis a las secuencias de flanqueo bajo las condiciones de hibridación. El oligonucleótido de direccionamiento puede comprender una secuencia personalizada entre el oligonucleótido de direccionamiento y la secuencia de la cabeza y/o cola. La Figura 4 ilustra una realización de tal sonda.

Las sondas que forman un círculo de ácido nucleico también incluyen sondas en las que las secuencias de la cabeza y la cola se proporcionan en diferentes moléculas de ácido nucleico. En tales casos, el círculo de ácido nucleico que se forma en las condiciones de hibridación comprenderá al menos tres moléculas de ácido nucleico, el fragmento objetivo, la secuencia de la cabeza y la secuencia de la cola. Los extremos de las moléculas de ácido nucleico estarán en yuxtaposición, como se señaló anteriormente. Se requieren más de dos reacciones de ligadura para formar la cadena circular continua de ácido nucleico en tales casos. Un ejemplo es cuando la secuencia de la cola es el extremo 3' del oligonucleótido de direccionamiento, y la sonda comprende un oligonucleótido de la cadena principal que tiene la secuencia de la cabeza en su extremo 5'. Bajo las condiciones de hibridación, la secuencia de la cola se une en forma cis a la secuencia de flanqueo secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y la secuencia de la cabeza del oligonucleótido de la cadena principal se une en forma trans a la secuencia de flanqueo secuencia arriba del oligonucleótido de direccionamiento. La unión en forma cis significa que la unión tiene lugar en la misma molécula de ácido nucleico, es decir, una sola cadena de ácido nucleico forma una estructura tridimensional en la que se juntan e hibridan diferentes regiones. La unión en forma trans significa que la unión tiene lugar entre diferentes moléculas de ácido nucleico. Opcionalmente, el oligonucleótido de la cadena principal comprende un par de secuencias repetidas invertidas que forman una estructura de horquilla bajo condiciones de hibridación, colocando así el extremo 3' del oligonucleótido de la cadena principal en yuxtaposición con el extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento. Existe un corte entre los dos extremos. Una sonda de este tipo se ilustra en la Figura 5. Cuando se proporcionan condiciones para la ligadura, el extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento se liga al extremo 3' del oligonucleótido de la cadena principal. El producto de la doble ligadura es un círculo de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido de direccionamiento, el fragmento objetivo y el oligonucleótido de la cadena principal. Alternativamente, cuando existe un hueco entre el extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento y el extremo 3' del oligonucleótido de la cadena principal, la sonda que se muestra en la Figura 5 no se circularizará por ligadura, en cambio, la cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo es una cadena lineal de ácido nucleico.

La sonda puede disponerse alternativamente en la orientación opuesta de modo que la secuencia de la cabeza esté en el extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento y la sonda comprende un oligonucleótido de la cadena principal que tiene la secuencia de cola en su extremo 3'. En este caso, bajo las condiciones de hibridación, la secuencia de la cabeza se une en forma cis a la secuencia de flanqueo secuencia arriba del oligonucleótido de direccionamiento, y la secuencia de la cola del oligonucleótido de la cadena principal se une en forma trans a la secuencia de flanqueo secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento. Nuevamente, el oligonucleótido de la cadena principal puede comprender un par de secuencias repetidas invertidas que forman una estructura de horquilla bajo condiciones de hibridación para colocar el extremo 5' del oligonucleótido de la cadena principal en yuxtaposición con el extremo 3' del oligonucleótido de direccionamiento. El extremo 3' del oligonucleótido de direccionamiento se liga luego al extremo 5' del oligonucleótido de la cadena principal para que el producto de doble ligadura sea un círculo de ácido nucleico que comprende el oligonucleótido de direccionamiento, el fragmento objetivo y el oligonucleótido de la cadena principal. Alternativamente, como se indicó anteriormente, la hibridación puede colocar el extremo 5' del oligonucleótido de la cadena principal cerca del extremo 3' del oligonucleótido de direccionamiento pero separado por un hueco de uno o más nucleótidos. El producto ligado será entonces una cadena lineal continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo.

El oligonucleótido de la cadena principal puede comprender una secuencia personalizada entre la secuencia de repetición invertida, de modo que, bajo las condiciones de hibridación, el oligonucleótido de la cadena principal forma un bucle de horquilla, como se ilustra en la Figura 5.

Como se indicó, las sondas pueden diseñarse de modo que la cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo sea una cadena lineal de ácido nucleico. Bajo las condiciones de hibridación en presencia del fragmento objetivo, las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanqueo, definiendo un hueco entre el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola. El fragmento objetivo hibrida con la secuencia complementaria del objetivo en el hueco, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de las secuencias de la cola, y completando una cadena de ácido nucleico que comprende el fragmento objetivo y las secuencias de la cabeza y la cola. Las moléculas de ácido nucleico que forman la cadena tienen sus extremos en yuxtaposición. El término yuxtaposición se ha discutido en otra parte. Existe un corte entre los extremos que se van a ligar. La ligadura de los extremos produce la cadena continua de ácido nucleico que comprende al menos las



secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo.

La sonda puede comprender un oligonucleótido de direccionamiento que tiene la secuencia de la cola en su extremo 3' y un oligonucleótido lineal de la cadena principal que tiene la secuencia de la cabeza en su extremo 5'. Bajo las condiciones de hibridación, la secuencia de cola se une en forma cis a la secuencia de flanqueo secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y la secuencia de la cabeza del oligonucleótido de la cadena principal se une en forma trans a la secuencia de flanqueo secuencia arriba del oligonucleótido de direccionamiento. El oligonucleótido de direccionamiento puede comprender una secuencia personalizada entre la secuencia de flanqueo secuencia abajo y la secuencia de la cola, de modo que, bajo las condiciones de hibridación, el oligonucleótido de direccionamiento forma un bucle de horquilla. La cadena lineal de ácido nucleico formada bajo las condiciones de hibridación comprende el oligonucleótido de la cadena principal, el fragmento objetivo y el oligonucleótido de direccionamiento. La Figura 6 ilustra esta disposición.

La sonda puede estar igualmente dispuesta en la orientación inversa, cuando la secuencia de la cabeza está en el extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento, y la sonda comprende un oligonucleótido de la cadena principal que tiene la secuencia de la cola en su extremo 3'. En este caso, la secuencia de la cabeza se une en forma cis a la secuencia de flanqueo secuencia arriba del oligonucleótido de direccionamiento y la secuencia de la cola del oligonucleótido de la cadena principal se une en forma trans a la secuencia de flanqueo secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento.

Otra forma de sonda que forma una cadena lineal de ácido nucleico como producto de la ligadura es una sonda que comprende las secuencias de la cabeza y la cola en oligonucleótidos separados de la cadena principal. Dicha sonda puede comprender un oligonucleótido de la cadena principal que comprende una secuencia de la cabeza que tiene un extremo 5' libre, y un oligonucleótido de la cadena principal que comprende una secuencia de la cola que tiene un extremo 3' libre, en la que, bajo condiciones de hibridación, las secuencias de la cabeza y la cola se unen en forma trans a las secuencias de flanqueo del oligonucleótido de direccionamiento. Uno o ambos oligonucleótidos de la cadena principal pueden comprender además una secuencia personalizada. La Figura 7 ilustra sondas de este tipo.

Preferiblemente, los oligonucleótidos de la sonda en su forma no ligada son lineales. Entonces, preferiblemente el oligonucleótido de direccionamiento es una molécula lineal de ácido nucleico. Para las sondas que incluyen uno o más oligonucleótidos de la cadena principal, estas también son preferiblemente lineales. Esto permite una diferenciación conveniente entre las sondas ligadas y no ligadas cuando se forma un círculo de ADN solo como resultado de la ligadura exitosa de las realizaciones de circularización de la sonda. Las moléculas lineales de ácido nucleico no se amplifican mediante la replicación en círculo rodante.

#### Amplificación de productos

La detección de señales en el presente método depende de las señales generadas por o desde sondas que reaccionaron correctamente después del reconocimiento del objetivo, usando hibridación específica de secuencia y catálisis enzimática para generar productos específicos a partir de los cuales se obtiene la señal. El presente método usa la detección de múltiples loci en una molécula objetivo de especies de ácido nucleico de interés como una etapa de amplificación de señal, y por lo tanto permite la generación y detección de señal sin requerir la amplificación de los productos de las sondas que reaccionaron. Se pueden obtener señales y se puede detectar una señal acumulativa sin amplificar los productos de ligadura. Opcionalmente, sin embargo, la señal de los productos múltiples puede amplificarse mediante etapas de amplificación de señal tradicionales.

Un método puede incluir enriquecer los productos de ligadura antes de la detección. Los productos pueden enriquecerse por amplificación y/o por química en fase sólida. Los productos circulares de ácido nucleico pueden enriquecerse selectivamente tratando la muestra con exonucleasa (por ejemplo, exonucleasa lambda) para digerir productos lineales de ácido nucleico. En general, la degradación por exonucleasa puede usarse para enriquecer productos de ligadura cuando los productos de ligadura están protegidos de la degradación por exonucleasa. La exonucleasa se debe desactivar (por ejemplo, por calor) antes de cualquier etapa posterior que implique polimerización, por ejemplo antes de la amplificación en círculo rodante. Como se ilustra en el Ejemplo 2, se puede agregar 1U de exonucleasa para eliminar sondas y fragmentos que no reaccionaron. Las condiciones adecuadas son la incubación a 37 °C durante 1 hora en el tampón de exonucleasa correspondiente, seguido de la inactivación enzimática a 80 °C durante 20 minutos. Cuando se utilizan métodos de captura/detección, los productos de ligadura pueden enriquecerse capturando los productos en una fase sólida a través de la fracción de captura. Como se ilustra en el Ejemplo 1, una solución que contiene productos de ligadura lineal puede mezclarse con 10 mL de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina M-280 (Invitrogen) en Tris-HCl (pH 7,5), EDTA 3,5 mM y Tween-20 al 0,07% en un volumen final de 200 mL, y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, las perlas se recogen usando un imán de anillo y se elimina el sobrenadante. Otras formas de enriquecimiento para productos de ligadura incluyen específicamente productos de ligadura de selección de tamaño.

Los productos de ligadura pueden amplificarse por amplificación clonal. Las técnicas de amplificación adecuadas incluyen la amplificación en círculo rodante (véase más abajo), PCR puente (Adessi C, et al., Nucleic Acids Res. 15 de oct de 2000; 28 (20): E87), PCR en emulsión (la PCR digital en emulsiones fue descrita por Dressman et al., Proc

Natl Acad Sci USA. 22 de julio de 2003; 100 (15): 8817-22. Epub del 11 de julio de 2003) y PCR digital (Vogelstein & Kinzler, Proc Natl Acad Sci USA. 3 de agosto de 1999; 96 (16): 9236-41). La amplificación clonal localizada en geles fue descrita por Mitra & Church, Nucleic Acids Res. 15 de diciembre de 1999; 27 (24): e34. Una realización del presente método puede comprender amplificar los productos de ligadura y obtener una señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de los productos amplificados. Preferiblemente, los productos de ligadura se amplifican a través de la unión de ligadura o, para productos de doble ligadura, a través de ambas uniones de ligadura.

Cuando los productos de ligadura son círculos de ácido nucleico, la amplificación puede comprender proporcionar condiciones para la replicación en círculo rodante de los círculos de ácido nucleico y detectar los productos de replicación en círculo rodante. La replicación en círculo rodante se describió en los documentos US 5.854.033 (Lizardi) y Fire & Xu, Proc Natl Acad Sci USA. 9 de mayo de 1995; 92 (10): 4641-5. La replicación en círculo rodante es una amplificación de una molécula circular de ácido nucleico usando ADN polimerasa para desplazamiento de cadena, lo que resulta en moléculas de ADN grandes que contienen repeticiones en tándem de la secuencia amplificada. La ADN polimerasa cataliza la extensión del cebador y el desplazamiento de la cadena en una reacción de polimerización en círculo rodante progresiva que se desarrolla todo el tiempo que se desee. Da como resultado una amplificación de la secuencia de la sonda circularizada con órdenes de magnitud superiores a un ciclo único de replicación de PCR y otras técnicas de amplificación en las que cada ciclo se limita a duplicar el número de copias de una secuencia objetivo. Se puede obtener una amplificación adicional usando una cascada de reacciones de desplazamiento de cadena. La replicación en círculo rodante puede ser una replicación en círculo rodante hiperramificada. RCA hiperramificada fue descrita por Lizardi et al., Nat Genet. Julio de 1998; 19 (3): 225-32. Las condiciones para la replicación en círculo rodante se ilustran en los Ejemplos, por ejemplo, la incubación con 1U de polimerasa phi29 (New England Biolabs) se puede agregar en el correspondiente tampón de phi29 y nucleótidos (dNTP) a 37 °C durante 1 hora.

#### Detección

Los productos de ligadura pueden ser detectables individualmente, de modo que se puede obtener una señal individual a partir de los productos de ligadura resultantes del reconocimiento de cada secuencia objetivo por su sonda correspondiente. Sin embargo, en el presente método, los productos de ligadura no necesitan ser detectados individualmente. Las señales individuales de los productos de ligadura se fusionan en una señal acumulativa y se detecta la señal acumulativa.

El tipo de señal y el método de detección pueden elegirse adecuadamente en función del tipo de sonda, o la sonda puede diseñarse para permitir un tipo de señal y método de detección deseados. El método no se limita a tipos particulares de señal o medios de detección de señal; más bien, el método puede realizarse mediante cualquier método de convertir señales individuales de la pluralidad de sondas en una única señal acumulativa detectable, amplificando así las señales individuales a través de la naturaleza múltiple de la etapa de sondeo.

En general, la detección de señales de productos de ligadura depende de la formación de cada producto después de la unión de la sonda a su secuencia objetivo, lo que indica si la secuencia objetivo estaba presente en la muestra. Por lo tanto, las señales pueden obtenerse específicamente de productos que incluyen una unión de ligadura o, para productos de doble ligadura, ambas uniones de ligadura. Pueden obtenerse señales individuales de cada unión de ligadura, formadas como resultado de la hibridación de la sonda con cada secuencia objetivo. Entonces, por ejemplo, cuando un conjunto de sondas comprende 10 sondas diferentes que reconocen 10 secuencias objetivo de las especies de interés, habrá 10 productos de ligadura que incluyen uniones de ligadura, y se puede detectar una señal acumulativa, que es la combinación de señales individuales de los 10 productos de ligadura. Por supuesto, en este ejemplo, el número real de sondas de moléculas, secuencias objetivo y productos de ligadura puede ser superior a 10 porque generalmente habrá múltiples copias de cada secuencia objetivo en una muestra y la muestra se contactará con múltiples copias de cada sonda.

Los productos de ligadura generados por las sondas de un conjunto pueden producir señales individuales características de ese conjunto, y que difieren de las señales obtenidas de los productos de ligadura generados por las sondas de un conjunto diferente, permitiendo distinguir las señales acumulativas de cada conjunto de sondas y cuantificarlas por separado. Por ejemplo, las sondas dentro de un conjunto pueden compartir una secuencia personalizada que es común a ese conjunto y difiere de las secuencias personalizadas de las sondas en otros conjuntos, lo que permite identificar convenientemente las sondas de cada conjunto. Cada conjunto de sondas puede contener al menos 500, 600, 700, 800, 900 o al menos 1.000 sondas diferentes para unir una pluralidad de secuencias objetivo específicas para la especie de ácido nucleico. Por ejemplo, un método puede usar 1.000 oligonucleótidos objetivo diferentes para cada uno de los cromosomas 21, 13 y 18, respectivamente, y tres conjuntos diferentes de sondas, cada conjunto marcado con una secuencia personalizada única, una para cada cromosoma. Si se desea, los motivos que codifican alelos y/o loci específicos se pueden incorporar en la secuencia personalizada con alta multiplicidad.

Las cantidades relativas de los dos o más cromosomas en una muestra pueden determinarse detectando las señales acumulativas de los productos de doble ligadura de cada uno de dos o más conjuntos de sondas, cada una de las cuales reconoce secuencias objetivo específicas para un cromosoma, y cuantificar las diferentes señales acumulativas.

Una manera conveniente de obtener señales de los productos de ligadura es proporcionar condiciones para la amplificación y comprobar la presencia del producto de amplificación. Son posibles varios enfoques de amplificación, tales como NASPA, LAMP, amplificación T7, PCR o, cuando el producto de ligadura es un círculo, replicación en círculo rodante. La obtención de señales puede implicar la amplificación a través de uniones de ligadura y la detección de señales de los productos de amplificación (por ejemplo, por PCR o, para realizaciones de circularización de la sonda, replicación en círculo rodante), o capturar la cadena continua de ácido nucleico en un extremo y detectar su otro extremo. Las señales pueden obtenerse a partir de productos de ligadura amplificados o no amplificados utilizando cualquiera de los sistemas de detección convencionales para ácidos nucleicos tales como la detección de etiquetas fluorescentes, sistemas de detección unidos a enzimas, detección de etiquetas mediada por anticuerpos y detección de etiquetas radiactivas. Preferiblemente, un producto de amplificación en círculo rodante se detecta por hibridación de un oligonucleótido de detección marcado con un motivo en el producto de RCA, por ejemplo, un motivo en una secuencia personalizada de la sonda. Debido a que la cantidad de producto de ligadura es directamente proporcional a la cantidad de secuencia objetivo presente en una muestra, las mediciones cuantitativas representan confiablemente la cantidad de una secuencia objetivo en una muestra. Las principales ventajas de este método son que la etapa de ligadura se puede manipular para obtener discriminación alélica, la etapa de replicación del ADN es isotérmica y las señales son estrictamente cuantitativas porque la reacción de amplificación es lineal y está catalizada por una enzima altamente procesadora. El oligonucleótido cebador utilizado para la reacción de ADN polimerasa puede ser el mismo para todas las sondas de un conjunto o para múltiples conjuntos de sondas en una mezcla de reacción.

Un ejemplo de detección de señal emplea una técnica de captura/etiqueta. Aquí, los productos de ligadura comprenden una fracción de captura en un lado de una unión de ligadura y una etiqueta en el otro lado de la unión de ligadura, y el método comprende obtener señales de los productos de ligadura capturando los productos de ligadura en un sustrato a través de la fracción de captura, lavar el sustrato y retener una fracción capturada que comprende el sustrato y el producto de ligadura capturado, y detectar las etiquetas en los productos de ligadura en la fracción capturada. Dichos métodos son especialmente adecuados cuando el producto de ligadura es lineal, de modo que se captura un extremo del producto y se detecta el otro. Sin embargo, los métodos también se pueden usar cuando el producto de ligadura es circular, al incluir una etapa de escisión del círculo para convertirlo en un producto lineal. La señal puede derivarse de una etiqueta heterogénea o una secuencia de la sonda, por ejemplo, una secuencia personalizada.

Se pueden usar señales fluorescentes, por ejemplo, marcando las sondas del primer y segundo conjunto con diferentes etiquetas fluorescentes. Por lo tanto, un método puede comprender poner en contacto el ácido nucleico en la muestra con un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas y detectar la primera y segunda señales acumulativas, en el que

la primera señal acumulativa es fluorescencia a una primera longitud de onda emitida por productos de ligadura generados por sondas del primer conjunto, y en el que la segunda señal acumulativa es fluorescencia a una segunda longitud de onda emitida por productos de ligadura generados por sondas del segundo conjunto.

En algunas de estas realizaciones, los productos de la replicación en círculo rodante de los productos de ligadura generados por las sondas del primer y segundo conjuntos están marcados de forma distinguible.

Los métodos de captura/detección son particularmente convenientes para usar con sondas que comprenden moléculas de ácido nucleico separadas (por ejemplo, secuencia de la cabeza y la cola en moléculas de ácido nucleico separadas). El producto de ligadura contiene secuencias de ambas moléculas (por ejemplo, las secuencias de la cabeza y la cola) en una sola molécula de ácido nucleico (el producto de ligadura), mientras que las sondas no ligadas no. En consecuencia, se pueden obtener señales de los productos de ligadura capturando la molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia (por ejemplo, la secuencia de la cabeza), lavando para eliminar el ácido nucleico de la sonda no ligada, y luego detectando la presencia de la otra secuencia (por ejemplo, la secuencia de la cola) en la fracción capturada. La detección es específica de las sondas ligadas, ya que en las sondas no ligadas las dos secuencias están conectadas solo por hibridación entre los ácidos nucleicos y se separan por lavado, mientras que las sondas ligadas contienen las dos secuencias a cada lado de una unión de ligadura en una cadena continua de ácido nucleico, es decir, unida covalentemente.

Como se indicó, las sondas pueden modificarse para transportar fracciones de captura. La fracción de captura, puede permitir la unión a un sustrato sólido tal como una perla. Una fracción de captura adecuada es biotina, que se combina con estreptavidina, permitiendo que el ácido nucleico de la sonda modificada se aísle en el sustrato sólido recubierto con estreptavidina. Puede ser conveniente proporcionar a la sonda la fracción de captura antes de combinar la sonda con la muestra. Alternativamente, la fracción de captura puede introducirse después de la etapa de ligadura.

Cuando una sonda comprende un oligonucleótido de la cadena principal que contiene la secuencia de la cabeza o la cola, y un ácido nucleico separado (oligonucleótido de direccionamiento, o un segundo oligonucleótido de la cadena principal) que contiene la cola o la cabeza, respectivamente, cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico puede portar una fracción de captura, por ejemplo, puede estar biotilada.

Cuando una molécula de ácido nucleico de una sonda porta una fracción de captura, la otra puede portar una etiqueta.

Es posible usar la secuencia de ácido nucleico en sí misma como una etiqueta, detectando una secuencia personalizada que identifica las moléculas de ácido nucleico a detectar, por ejemplo, está presente en todas las sondas de un conjunto pero no en las sondas de otro conjunto. Se puede usar un oligonucleótido complementario para la detección. Alternativamente, el ácido nucleico puede portar una etiqueta heterogénea tal como un fluoróforo. La etiqueta heterogénea no es parte del ácido nucleico en sí. Otras etiquetas que se pueden usar incluyen puntos cuánticos, bioluminiscencia, cascadas de enzimas generadoras de señal tal como amplificación de señal de tiramida y fracciones radiactivas. El método puede comprender entonces detectar la presencia de la etiqueta, por ejemplo, detectar fluorescencia, detectar los puntos cuánticos, detectar bioluminiscencia, detectar la señal generada por la enzima o detectar radiactividad, respectivamente.

Como ejemplo, la obtención de señales de los productos de ligadura puede comprender capturar oligonucleótidos de la cadena principal de las sondas en un sustrato a través de la fracción de captura, lavar el sustrato para eliminar las sondas no ligadas y retener una fracción capturada que comprende el sustrato y los oligonucleótidos capturados de la cadena principal, y obtener señales de los productos de doble ligadura en la fracción capturada. Cuando el producto de doble ligadura porta una etiqueta, esto puede comprender detectar la etiqueta en la fracción capturada.

La fracción de captura puede ser una molécula de biotina con afinidad por un sustrato de estreptavidina. Otras etiquetas de afinidad adecuadas incluyen etiquetas de polihistidina con afinidad por iones metálicos inmovilizados, tales como cobalto, níquel, cobre, que pueden usarse para la purificación de secuencias que contienen histidina, por ejemplo, oligonucleótidos de la cadena principal. La fracción de captura puede ser, por lo tanto, parte de la secuencia a capturar, por ejemplo, una secuencia de etiqueta His, o puede ser una fracción heterogénea que no es parte del ácido nucleico en sí.

Un sustrato sólido adecuado es una perla, por ejemplo perlas magnéticas para facilitar el enriquecimiento de los productos capturados usando un imán. El sustrato puede recubrirse con un miembro de unión para la fracción de captura, por ejemplo, las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina pueden usarse con sondas biotiniladas.

#### Cuantificación

La cuantificación determina la cantidad de especies de ácido nucleico en la muestra. En algunos casos, esta cantidad puede determinarse y compararse con un control conocido, lo que permite la determinación de la cantidad absoluta o relativa de ácido nucleico en la muestra. En otros casos, se pueden sondear múltiples especies de ácido nucleico dentro de una muestra, por ejemplo, simultáneamente. Esto permite utilizar una especie de ácido nucleico como referencia, cuantificando las diferentes especies de ácido nucleico entre sí, por ejemplo, determinando que una muestra contiene más del cromosoma 21 que el cromosoma 1.

La cantidad puede expresarse como concentración o cantidad (por ejemplo, moles o masa), siendo los dos intercambiables cuando la concentración es la cantidad de ácido nucleico dividida por el volumen de la muestra.

#### Sondas

Ejemplos de sondas y sus características ya se han descrito anteriormente. Algunas características y ejemplos adicionales se describen en el presente documento.

El ácido nucleico de la sonda es preferiblemente ADN. Sin embargo, puede ser otro ácido nucleico, natural o no. Las bases estándar de ADN son A, T, C y G, pero el ácido nucleico de la sonda del método puede incluir opcionalmente nucleótidos no estándar.

En general, una sonda para usar en los métodos del presente método puede comprender un oligonucleótido de direccionamiento y secuencias de la cabeza y la cola. Las secuencias de la cabeza y la cola pueden ser parte del oligonucleótido de direccionamiento o uno o ambos pueden estar en una molécula de ácido nucleico diferente. Opcionalmente, la sonda comprende el oligonucleótido de direccionamiento, un oligonucleótido de la cadena principal que comprende la secuencia de la cabeza y un oligonucleótido de la cadena principal que comprende la secuencia de la cola. Por lo tanto, una sonda puede comprender una, dos o tres moléculas de ácido nucleico en su forma no ligada.

Preferiblemente, las sondas son para hibridarse con secuencias objetivo que son fragmentos de una secuencia definida generados a partir de las especies de ácido nucleico que se cuantificarán o identificarán. Estas secuencias objetivo pueden denominarse fragmentos objetivo.

El oligonucleótido de direccionamiento es más largo que el fragmento objetivo y contiene una secuencia complementaria interna del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y el fragmento objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento. Las secuencias de la cabeza y la cola tienen extremos 5' y 3' libres respectivamente, y son complementarias a las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente. En condiciones de hibridación en presencia del fragmento objetivo, las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanqueo, definiendo un hueco entre el extremo 5' de la secuencia de la cabeza

y el extremo 3' de la secuencia de la cola, en la que el fragmento objetivo se hibrida con la secuencia complementaria del objetivo en el hueco, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de las secuencias de la cola.

5 Las sondas de este tipo pueden usarse para detectar una especie de ácido nucleico en un método que comprende:

- (i) proporcionar una muestra en la que la especie de ácido nucleico se fragmenta en fragmentos objetivo,
- (ii) proporcionar condiciones de desnaturalización bajo las cuales los fragmentos objetivo son monocatenarios
- (iii) poner en contacto la muestra con un conjunto de sondas, en las que cada sonda reconoce específicamente una  
10 secuencia objetivo distinta dentro de la especie de ácido nucleico a detectar, en las que las secuencias objetivo son secuencias de los fragmentos objetivo, y en las que cada sonda comprende un oligonucleótido de direccionamiento que es más largo que el fragmento objetivo y contiene una secuencia interna complementaria del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y el fragmento  
15 objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y secuencias de la cabeza y la cola que tienen extremos 5' y 3' libres respectivamente, en los que las secuencias de la cabeza y la cola son complementarias a las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente,
- (iv) proporcionar condiciones de hibridación bajo las cuales las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las  
20 secuencias de flanqueo, y los fragmentos objetivo, si están presentes, se hibridan con la secuencia complementaria del objetivo de las sondas, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola
- (v) proporcionar condiciones para la ligadura de modo que, si un fragmento objetivo está presente, el extremo 3' del fragmento objetivo se liga al extremo 5' de la secuencia de la cabeza para formar una primera unión de ligadura, y el  
25 extremo 5' del fragmento objetivo se liga al extremo 3' de la secuencia de la cola para formar una segunda unión de ligadura, produciendo un producto de doble ligadura que comprende una cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo, y
- (vi) detectar una señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de todos los productos, en la que la detección de la señal indica la presencia de la especie de ácido nucleico en la muestra.

30 Las especies de ácido nucleico pueden cuantificarse mediante un método que comprende:

- (i) proporcionar una muestra en la que la especie de ácido nucleico se fragmenta en fragmentos objetivo
- (ii) proporcionar condiciones de desnaturalización bajo las cuales los fragmentos objetivo son monocatenarios
- (iii) poner en contacto la muestra con un conjunto de sondas, en el que cada sonda reconoce específicamente un  
35 fragmento objetivo distinto de la especie de ácido nucleico a cuantificar, en el que cada sonda comprende un oligonucleótido de direccionamiento que es más largo que el fragmento objetivo y contiene una secuencia interna complementaria del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y el fragmento objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y  
40 las secuencias de la cabeza y la cola que tienen extremos 5' y 3' libres respectivamente, en las que las secuencias de la cabeza y la cola son complementarias a las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente,
- (iv) proporcionar condiciones de hibridación bajo las cuales las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las  
45 secuencias de flanqueo, y los fragmentos objetivo, si están presentes, se hibridan con la secuencia complementaria del objetivo de las sondas, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola
- (v) proporcionar condiciones para la ligadura de modo que, si un fragmento objetivo está presente, el extremo 3' del fragmento objetivo se liga al extremo 5' de la secuencia de la cabeza para formar una primera unión de ligadura, y el  
50 extremo 5' del fragmento objetivo se liga al extremo 3' de la secuencia de la cola para formar una segunda unión de ligadura, produciendo un producto de doble ligadura que comprende una cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo,
- (vi) detectar una señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de todos los productos de ligadura, y
- (vii) cuantificar la señal acumulativa para determinar un nivel de señal, en el que el nivel de señal es proporcional a la  
55 cantidad de especies de ácido nucleico en la muestra, y determinar así la cantidad de especies de ácido nucleico en la muestra.

60 El método se puede usar para cuantificar una primera especie de ácido nucleico en relación con una segunda especie de ácido nucleico en una muestra. Por consiguiente, el método puede comprender:

- (i) proporcionar una muestra en la que la primera y la segunda especie de ácido nucleico se fragmentan en fragmentos objetivo
- (ii) proporcionar condiciones de desnaturalización bajo las cuales los fragmentos objetivo son monocatenarios
- (iii) poner en contacto la muestra con un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas, en el que las  
65 sondas del primer conjunto reconocen específicamente fragmentos objetivo distintos de la primera especie de ácido

nucleico y en el que las sondas del segundo conjunto reconocen específicamente fragmentos objetivo distintos de la segunda especie de ácido nucleico, en el que cada sonda comprende

un oligonucleótido de direccionamiento que es más largo que el fragmento objetivo y contiene una secuencia interna complementaria del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y el fragmento objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento, y

las secuencias de la cabeza y la cola que tienen extremos 5' y 3' libres respectivamente, en las que las secuencias de la cabeza y la cola son complementarias a las secuencias de flanco secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente,

(iv) proporcionar condiciones de hibridación bajo las cuales las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanco, y los fragmentos objetivo, si están presentes, se hibridan con la secuencia complementaria del objetivo de las sondas, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola

(v) proporcionar condiciones para la ligadura de modo que, si un fragmento objetivo está presente, el extremo 3' del fragmento objetivo se liga al extremo 5' de la secuencia de la cabeza para formar una primera unión de ligadura, y el extremo 5' del fragmento objetivo se liga al extremo 3' de la secuencia de la cola para formar una segunda unión de ligadura, produciendo un producto de doble ligadura que comprende una cadena continua de ácido nucleico que comprende las secuencias de la cabeza y la cola y el fragmento objetivo,

(vi) detectar una primera señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de los productos de ligadura generados por las sondas del primer conjunto, y cuantificarla para determinar un primer nivel de señal, en el que el primer nivel de señal es proporcional a la cantidad de la primera especie de ácido nucleico en la muestra,

(vii) detectar una segunda señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de los productos de ligadura generados por sondas del segundo conjunto, y cuantificarla para determinar un segundo nivel de señal, en el que el segundo nivel de señal es proporcional a la cantidad de la segunda especie de ácido nucleico en la muestra, y

(viii) comparar el primer y segundo niveles de la señal, determinando así las cantidades relativas de la primera y segunda especie de ácido nucleico en la muestra.

Las sondas pueden diseñarse de modo que la hibridación del fragmento objetivo en el hueco complete un círculo de ácido nucleico, comprendiendo el círculo el fragmento objetivo y las secuencias de la cabeza y la cola.

La secuencia de la cabeza y/o la cola de la sonda se une preferiblemente a una secuencia personalizada que no es complementaria a otras regiones de la sonda o al fragmento objetivo.

En algunas realizaciones de la sonda, una sola molécula de ácido nucleico comprende las secuencias de la cabeza y la cola.

Las secuencias de la cabeza y la cola pueden estar separadas del oligonucleótido de direccionamiento para que se unan en forma trans a las secuencias de flanco. Por ejemplo, las secuencias de la cabeza y la cola pueden estar en los extremos 5' y 3' respectivamente de un oligonucleótido de la cadena principal. Se puede incluir una secuencia personalizada entre las secuencias de la cabeza y la cola del oligonucleótido de la cadena principal. Un ejemplo de tal sonda se muestra en la Figura 3. Alternativamente, las secuencias de la cabeza y la cola del oligonucleótido de la cadena principal pueden ser adyacentes, sin secuencia de nucleótidos intermedia. En tal caso, las secuencias de flanco del oligonucleótido de direccionamiento hibridan a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido de la cadena principal y pueden circularizarlo.

Las sondas pueden diseñarse de modo que la secuencia de la cabeza sea un extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento y/o la secuencia de la cola sea un extremo 3' del oligonucleótido de direccionamiento, de modo que la hibridación del fragmento objetivo en el hueco complete una cadena de ácido nucleico que comprende el fragmento objetivo, las secuencias de la cabeza y la cola, la secuencia complementaria del objetivo y las secuencias de flanco.

Las secuencias de la cabeza y la cola pueden estar en los extremos del oligonucleótido de direccionamiento y unirse en forma cis a las secuencias de flanco. Un ejemplo de tal sonda se muestra en la Figura 4. En esta versión de la sonda, las secuencias de la cabeza y la cola y la secuencia complementaria del objetivo se vuelven circulares con el fragmento objetivo. Las secuencias personalizadas se pueden colocar en los bucles del oligonucleótido. El ácido nucleico de la sonda es relativamente largo, pero tiene la ventaja de unir la estructura de oligonucleótidos en una molécula que está preensamblada y no requiere hibridación de diferentes moléculas de ácido nucleico de la sonda.

Las sondas también pueden diseñarse con un oligonucleótido de cadena principal, que es una molécula separada de ácido nucleico del oligonucleótido de direccionamiento. La secuencia de la cola puede ser un extremo 3' del oligonucleótido de direccionamiento y la secuencia de la cabeza un extremo 5' de un oligonucleótido de la cadena principal. Alternativamente, la secuencia de la cabeza puede ser un extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento y la secuencia de la cola un extremo 3' de un oligonucleótido de la cadena principal. Se puede introducir una secuencia personalizada en el oligonucleótido de direccionamiento, por ejemplo, para proporcionar un bucle entre la secuencia de la cabeza o la cola y la secuencia de flanco. Una ventaja con el uso de este enfoque de sonda es que se puede introducir una secuencia de detección en el bucle y se asocia con la secuencia complementaria del objetivo, lo que puede ser ventajoso para los métodos múltiples, especialmente los múltiples más altos con esquemas de detección aún más altos. El oligonucleótido de la cadena principal puede comprender además una secuencia personalizada. Al

proporcionar la sonda en dos oligonucleótidos, las moléculas de ácido nucleico de la sonda son más cortas que la versión de un solo oligonucleótido pero mantienen la misma función.

Otro diseño de la sonda proporciona las secuencias de la cabeza y la cola en dos oligonucleótidos de la cadena principal. Por lo tanto, la sonda comprende:

un oligonucleótido de direccionamiento que es más largo que el fragmento objetivo y contiene una secuencia interna complementaria del objetivo, de modo que la hibridación entre el oligonucleótido de direccionamiento y el fragmento objetivo forma una secuencia bicatenaria ubicada entre las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo del oligonucleótido de direccionamiento,

un oligonucleótido de la cadena principal que comprende una secuencia de la cabeza que tiene un extremo 5' libre, y un oligonucleótido de la cadena principal que comprende una secuencia de la cola que tiene un extremo 3' libre, en la que las secuencias de oligonucleótidos de la cabeza y la cola son complementarias a las secuencias de flanqueo secuencia arriba y secuencia abajo respectivamente.

Un oligonucleótido de la cadena principal puede portar una fracción de captura, en cuyo caso el otro oligonucleótido de la cadena principal se usa para la detección y puede portar una etiqueta heterogénea. Uno o ambos oligonucleótidos de la cadena principal pueden comprender además una secuencia personalizada. Alternativa o adicionalmente, el oligonucleótido de direccionamiento puede incluir una secuencia personalizada.

En condiciones de hibridación en presencia del fragmento objetivo, las secuencias de la cabeza y la cola se hibridan con las secuencias de flanqueo, definiendo un hueco entre el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de la secuencia de la cola, en la que el fragmento objetivo se hibrida con la secuencia complementaria del objetivo en el hueco, colocando así los extremos del fragmento objetivo en yuxtaposición con el extremo 5' de la secuencia de la cabeza y el extremo 3' de las secuencias de la cola. La hibridación del fragmento objetivo en el hueco completa una cadena de ácido nucleico que comprende el fragmento objetivo y las secuencias de la cabeza y la cola. La cadena porta la fracción de captura y la etiqueta, lo que permite la detección utilizando los métodos de captura/detección descritos en otra parte del presente documento.

Cariotipado digital y diagnóstico prenatal no invasivo

Algunas implementaciones del presente método proporcionan ventajas particulares en campos en los que se busca la cuantificación precisa del ADN objetivo. Esto incluye una serie de técnicas de diagnóstico basadas en ácido nucleico. Una de esas áreas es el análisis del ADN del cáncer en una muestra biológica (por ejemplo, sangre) de un paciente. Otra de estas áreas es el diagnóstico prenatal no invasivo (NIPT) mediante el análisis de ADN libre de material celular.

Un desafío con NIPT es que se debe contar con un gran número de fragmentos de genoma específicos para lograr la confianza estadística requerida para diagnosticar una aneuploidía cromosómica. Dado que el ADN fetal se mezcla con el ADN materno, formando el 4-30% del material genético en el torrente sanguíneo de una mujer embarazada, la observación de una aneuploidía cromosómica en el ADN fetal requiere una medición muy precisa.

El presente método puede usarse para analizar el ADN fetal de circularización libre en muestras de sangre materna. Al utilizar una pluralidad de sondas dirigidas a diferentes fragmentos de un cromosoma y una pluralidad de sondas dirigidas a diferentes fragmentos de un segundo cromosoma, el método permite determinar con gran confianza un desequilibrio en el número relativo de los dos cromosomas en la muestra. Esto permite que las aneuploidías cromosómicas, como la trisomía, se diagnostiquen a partir del ADN fetal incluso en el contexto más elevado del ADN materno.

El presente método puede usarse para, por ejemplo, analizar muestras de sangre materna de mujeres embarazadas para detectar ácido nucleico fetal para el diagnóstico de anomalías cromosómicas tales como trisomía, analizar muestras de pacientes para detectar ADN tumoral para el diagnóstico o monitorizar la presencia de un tumor en el paciente. Otros usos incluyen analizar muestras de material para detectar la presencia de ácido nucleico microbiano, en la que la detección del ácido nucleico microbiano indica la infección del material por el microbio, que puede ser un agente infeccioso tal como una bacteria, virus u hongo. La muestra puede ser una muestra de tejido o sangre de un paciente.

Más generalmente, al usar cientos o miles de sondas diferentes, algunas implementaciones del presente método pueden lograr una alta precisión al detectar cientos o miles de fragmentos de ácido nucleico específicos, proporcionando ventajas en una amplia gama de aplicaciones de diagnóstico. La detección de una multitud de fragmentos de ADN del cromosoma o los loci cromosómicos asociados con una enfermedad particular permite medir la cantidad de ese cromosoma o locus en relación con un cromosoma o locus de control, de modo que incluso pequeñas diferencias en una muestra pueden detectarse con confianza.

Al analizar fragmentos objetivo cortos, se puede analizar con gran eficacia una gran proporción del ADN libre de material celular altamente fragmentado en la sangre materna. Esto es importante ya que hay cantidades muy bajas de ADN libre de material celular disponible en la sangre materna.

Un método para cuantificar un primer cromosoma o locus cromosómico con respecto a un segundo cromosoma o locus cromosómico en una muestra de ácido nucleico obtenido de un individuo puede comprender poner en contacto la muestra con un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas, en el que las sondas del primer conjunto reconocen cada una específicamente una secuencia objetivo distinta dentro del primer cromosoma o locus cromosómico y en el que las sondas del segundo conjunto reconocen específicamente cada una, una secuencia objetivo distinta dentro del segundo cromosoma o locus cromosómico, proporcionar condiciones bajo las cuales las secuencias objetivo en el primer y segundo cromosomas o loci cromosómicos son al menos parcialmente monocatenarios, proporcionar condiciones para hibridación y ligadura, bajo las cuales las sondas hibridan con sus secuencias objetivo y generan productos de ligadura, detectar una primera señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de los productos de ligadura generados por sondas del primer conjunto y cuantificarla para determinar un primer nivel de señal, en el que el primer nivel de señal es proporcional a la cantidad del primer cromosoma o locus cromosómico en la muestra, detectar una segunda señal acumulativa que es una combinación de señales individuales de los productos de ligadura generados por sondas del segundo conjunto y cuantificarla para determinar un segundo nivel de señal, en el que el segundo nivel de señal es proporcional a la cantidad del segundo cromosoma o locus cromosómico en la muestra, y comparar el primero y segundo niveles de la señal, determinando así las cantidades relativas del primer y segundo cromosomas o el primer y segundo loci cromosómico en la muestra.

El método puede usarse para diagnosticar aneuploidía (por ejemplo, trisomía) en un feto, en el que la muestra de ácido nucleico es una muestra obtenida de sangre materna y contiene ADN fetal fuera de las células mezclado con ADN materno, y en el que una proporción desigual del primero y segundo niveles de la señal son indicativos de aneuploidía (por ejemplo, trisomía).

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la detección y cuantificación de ADN fetal de circularización libre en sangre materna usando el presente método.

Se recoge una muestra de sangre de la madre embarazada y se extrae el ADN de circularización libre del plasma sanguíneo. Luego, el ADN se hace reaccionar con sondas de ADN específicas dirigidas que reaccionan específicamente con fragmentos de ADN procedentes de los cromosomas sometidos a análisis y cuantificación. En este ejemplo, se ilustra el uso de las llamadas "sondas Lotus" para apuntar y reaccionar con fragmentos específicos del cromosoma 21 y un cromosoma de referencia. Sin embargo, se podrían utilizar otras tecnologías basadas en sondas para atacar fragmentos de ADN específicos, tales como sondas de candado/sondas de inversión molecular (MIP), sondas selectoras, sondas de ligadura de oligonucleótidos.

Se proporcionan sondas Lotus que se dirigen a múltiples fragmentos de cada uno de los dos cromosomas. Tras el reconocimiento del objetivo, las sondas generan un producto de ligadura con sus fragmentos correspondientes, que tienen un extremo marcado con fluorescencia y el otro con una biotina. Los productos de ligadura están etiquetados con dos fluoróforos diferentes, cada uno de los cuales representa los cromosomas individuales a los que se dirige. El protocolo puede ilustrarse como:

1) Se digieren 10 ng de ADN con 1 unidad de enzima de restricción en el correspondiente tampón de enzima de restricción compatible. La reacción se incuba a 37 °C durante 1 h, seguido de desactivación enzimática a 80 °C durante 20 min.

2) Los fragmentos de ADN se desnaturalizan en fragmentos monocatenarios a 95 °C durante 10 minutos y se mezclan con sondas y ligasa para formar productos de ligadura lineales. El conjunto de sondas se agrega en una concentración individual de 10 pM junto con 1 U de Ampligasa (Epicentre) y se incuba a 55 °C durante 1 h en tampón de ligasa.

3) El producto de ligadura se captura en perlas magnética de estreptavidina. Para eliminar las sondas y fragmentos no reaccionados, la solución se mezcla con 10 mL de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina M-280 (Invitrogen) en Tris-HCl (pH 7,5), EDTA 3,5 mM y Tween-20 al 0,07% en un volumen final de 200 mL. y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Después de la incubación, las perlas se recogen usando un imán de anillo y se elimina el sobrenadante.

4) Las restantes sondas unidas a las perlas se detectan y cuantifican. La intensidad de fluorescencia total se mide para cada una de las dos etiquetas y la intensidad relativa se mide entre los dos colores.

5) En el caso del diagnóstico prenatal, el resultado final se basa en la cantidad relativa de fluorescencia. Un ejemplo simplificado; si 1000 equivalentes del genoma y el 10% de todo el ADN de circularización libre en la sangre materna se deriva del feto, y se usan 1000 sondas de direccionamiento al cromosoma 21 para generar la fluorescencia total, una muestra normal generaría una señal de 1.000.000 de fluoróforos por lo que una muestra con feto con trisomía 21 generaría una señal correspondiente a 1.050.000 fluoróforos. Además, para lograr una mayor precisión estadística si



1000 sondas están dirigidas a regiones de "normalización" que no están sujetas a aneuploidía y están marcadas con un segundo fluoróforo, se puede medir una cantidad relativa.

### Ejemplo 2

En el siguiente ejemplo, las sondas Lotus se dirigen a múltiples fragmentos de cada uno de los dos cromosomas. Tras el reconocimiento del objetivo, las sondas generan un producto de ligadura circularizado con sus fragmentos correspondientes. Los productos de ligadura circularizados contienen cualquiera de los dos motivos de secuencia que se pueden usar para el etiquetado posterior, y cada motivo de secuencia corresponde a cualquiera de los dos cromosomas a los que se dirige. El protocolo puede ilustrarse como:

1) Se digieren 10 ng de ADN con 1 unidad de enzima de restricción en el correspondiente tampón de enzima de restricción compatible. La reacción se incuba a 37 °C durante 1 h, seguido de desactivación enzimática a 80 °C durante 20 min.

2) Los fragmentos de ADN se desnaturalizan hasta fragmentos monocatenarios a 95 °C durante 10 minutos y se mezclan con sondas y ligasa para formar círculos. El conjunto de sondas se agrega en una concentración individual de 10 pM junto con 1U de Ampligasa (Epicentre) y se incuba a 55 °C durante 1 h en tampón de ligasa.

3) Se agrega 1U de exonucleasa para eliminar las sondas y fragmentos no reaccionados. Se añade 1 U de exonucleasa Lambda (Epicentre) a 37 °C durante 1 h en el tampón de exonucleasa correspondiente, seguido de la inactivación enzimática a 80 °C durante 20 min.

4) Los círculos restantes se copian mediante amplificación en círculo rodante, RCA. Se agrega 1U de polimerasa phi29 (New England Biolabs) en el correspondiente tampón de phi29 y nucleótidos (dNTP) a 37 °C durante 1 h. Las sondas complementarias a los productos de RCA, cada una etiquetada con cualquiera de los dos fluoróforos diferentes, se agregan a la mezcla de RCA. Los productos de RCA etiquetados resultantes se cuentan individualmente y el número relativo de productos de RCA se mide entre los dos colores.

5) En el caso del diagnóstico prenatal, el resultado final se basa en la cantidad relativa de fluorescencia. Un ejemplo simplificado; si 1000 equivalentes del genoma y el 10% de todo el ADN de circularización libre en la sangre materna se deriva del feto, y se usan 1000 sondas de direccionamiento del cromosoma 21 para generar la fluorescencia total, una muestra normal generaría una señal de 1.000.000 de fluoróforos por lo que una muestra con feto con trisomía 21 generaría una señal correspondiente a 1.050.000 fluoróforos. Además, para lograr una mayor precisión estadística si 1000 sondas están dirigidas a regiones de "normalización" que no están sujetas a aneuploidía y están marcadas con un segundo fluoróforo, se puede medir una cantidad relativa.

### Ejemplo 3

## Materiales y métodos

Preparación de la muestra: se recogieron 10 mL de sangre de cada sujeto en un tubo de ADN libre de material celular (Streck, Omaha, NE). El plasma se aisló de la sangre mediante un protocolo de doble centrifugación (1600 xg durante 10 min, seguido de 16.000 xg durante 10 min, después de una transferencia de tubo después del primer giro). El ADN libre de material celular se aisló mediante el kit de ácido nucleico Qiagen ccf (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN resultante se eluyó en 50 µL de tampón (parte del kit de Qiagen).

Diseño de la sonda y la cadena principal: la tecnología de sonda multiplexada en el presente documento descrita permite la amplificación específica y simultánea de miles de fragmentos cromosómicos. Las sondas se diseñaron para capturar 2500-5000 fragmentos (objetivos) de cada uno de los cromosomas 21, 18 y 13. Los objetivos se seleccionaron para tener una secuencia única en el genoma, composición AT/GC uniforme, no incluyen polimorfismo conocido ni CNV en la secuencia objetivo, y un tamaño entre 18-35 pb. Las sondas dirigidas a 2500 fragmentos de cada cromosoma 13 y 18 se agruparon junto con 5000 sondas dirigidas a fragmentos del cromosoma 21 para crear un único grupo de sondas de oligo.

Ejemplo de secuencia de sondas, "N" representa la secuencia complementaria del objetivo:

**A**TGTGACCCTTCCGTCTGTTGAGTTAGGCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

TCGTGCCTTGTCAATCGGGAGCACTAACTGCTG (SEQ ID NO:1)

Las cadenas principales, con secuencias de la cabeza y la cola complementarias a los extremos de la sonda, se diseñaron para incluir motivos de secuencia tanto para la secuenciación como para el recuento digital. Se utilizaron dos cadenas principales en los experimentos descritos en la sección de resultados; una complementaria a las sondas dirigidas a los cromosomas 13 y 18:

(/5Phos/CGCACACGATTAAGGTCCAGTCACAGGCAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGG  
AAAGAGTGTNNNNNNNNNNGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATTTATGCTGCTAAC  
GGTCGAGTCGGACGGACA SEQ ID NO: 2, y una la cadena principal dirigida al cromosoma 21:

(/5Phos/GGCCTAACTCAACAGACGGAAGGGTCACATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGG  
AAAGAGTGTNNNNNNNNNGTGTAGATCTCGGTGGTGGCCGTATCATTTCATGCTGCTAAC  
GGTCGAGCAGTTAGTGCTCCCGAATGACAAGGCACGA; SEQ ID NO:3).

Protocolo bioquímico de la sonda: se digirieron 50 µL de ADN libre de material celular purificado con 5U de MseI (New England Biolabs) en tampón NEB4 1x (New England Biolabs) y BSA 1x en un volumen total de 55 µL a 37 °C en 30 minutos seguido de inactivación por calor a 65 °C en 20 min. El ADN digerido se mezcló luego con la mezcla de ligadura junto con sondas y cadenas principales. Los 55 µL del ADN digerido se mezclaron con sondas (1 pM/sonda), cadenas principales (60 nM cada una), tampón de ligadura 1x (Epicentre), 100 U de Ampligasa (Epicentre), NAD 1mM y Mg<sup>2+</sup> 5 mM hasta un volumen total de 70 µL. Los fragmentos digeridos se desnaturalizaron primero hasta un ADN monocatenario a 95 °C en 5 minutos, seguido por hibridación y ligadura a 55 °C en 16 horas. La mezcla de ligadura se trató luego con exonucleasas para eliminar cualquier molécula de ADN lineal restante. La reacción de ligadura se mezcló con 20 U de ExoI (NEB) y 5 U de ExoIII (NEB) y BSA 1x hasta un volumen total de 75 µL a 37 °C durante 60 minutos seguido de inactivación por calor a 65 °C durante 10 min.

Análisis: para el análisis de secuenciación, los círculos tratados con exo se amplificaron con cebadores de secuenciación complementarios al instrumento de secuenciación Illumina y posteriormente se cargaron en el instrumento Illumina MiSeq de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

Para el análisis digital, las reacciones tratadas con exo se sometieron a una reacción de amplificación en círculo rodante (RCA) para generar objetivos de ADN discretos de copias concatémicas del círculo. Se mezclaron 37,5 µL de círculos tratados con exo con DTT 4 mM, 3 U de polimerasa phi29 (NEB), cebador 0,1 µM, mezcla de dNTP 1 mM (NEB) y BSA 1x hasta un volumen total de 50 µL, y se incubaron a 37 °C durante 1 h seguido de una inactivación por calor a 65 °C durante 10 min. La reacción de RCA se marcó luego con oligonucleótidos marcados con fluorescencia complementarios a la secuencia de la cadena principal. Se mezclaron 50 µL de productos de RCA con Tween 20 al 0,1% (Sigma), oligonucleótidos marcados 5 nM y SSC 2x (Sigma) en un volumen total de 100 µL. Los productos de RCA marcados finalmente se depositaron en un portaobjetos de microscopio recubierto con polilisina (Sigma) y se contaron en un microscopio de fluorescencia.

#### Resultados

El método de sonda descrito en este documento se demostró en secuenciación de Illumina y un sistema de conteo digital. Para demostrar el rendimiento del método de la sonda, se mezcló una muestra de ADN con trisomía 21 con ADN extraído de muestras de plasma normales (3-5 mL de plasma) en diferentes concentraciones. Luego, las muestras se llevaron a través del método de sonda y se evaluaron mediante secuenciación.

Para los resultados mostrados en la Figura 8, 100 ng de ADN de línea celular se sometieron al protocolo descrito anteriormente. Se mezclaron 10.000 sondas en un grupo para circularizar específicamente 10.000 fragmentos cromosómicos correspondientes del cromosoma 13, 18 y 21. Los 10.000 círculos resultantes se amplificaron con cebadores de PCR correspondientes de Illumina y se analizaron en gel antes de la secuenciación. El carril 1 corresponde a la escalera de ADN, el carril 2 a la muestra de ADN después de la digestión y el carril 3 al producto de PCR con 10.000 fragmentos amplificados.

Para los resultados mostrados en la Figura 9, se analizaron 12 muestras de plasma normales en paralelo con muestras que portan ADN con trisomía 21 en diferentes concentraciones. El ADN se extrajo y procesó a través del protocolo de sonda 10 mil veces mayor y finalmente se secuenciaron en el secuenciador Illumina. Utilizando un intervalo de confianza que proporciona una especificidad del 99%, las muestras positivas se detectan con una sensibilidad del 90% en función de las distribuciones normales estimadas.

En cualquier realización, el primer cromosoma puede ser el cromosoma 21, 13 o 18.

En cualquier realización, la mezcla de sondas puede comprender un segundo conjunto de sondas, en el que las sondas del segundo conjunto de sondas se hibridan con diferentes sitios en un segundo cromosoma y forman productos circulares no covalentes que contienen uniones ligables adyacentes cuando se hibridan con fragmentos de ADN del segundo cromosoma; y la etapa e) comprende cuantificar por separado el número de moléculas del producto de amplificación en círculo rodante que corresponden al primer y segundo cromosoma, proporcionando así una estimación de la cantidad relativa de ADN correspondiente al primer y segundo cromosoma en la muestra.

En algunas realizaciones, el primer conjunto de sondas se hibrida con diferentes sitios en una primera región de un primer cromosoma. En estas realizaciones, la mezcla de sondas puede comprender un segundo conjunto de sondas, en donde las sondas del segundo conjunto de sondas se hibridan con diferentes sitios en una segunda región en el primer cromosoma y forman productos circulares no covalentes que contienen uniones ligables adyacentes cuando se hibridan con fragmentos de ADN del segundo cromosoma; y la etapa e) comprende cuantificar por separado el número de moléculas del producto de amplificación en círculo rodante que corresponden a la primera y segunda regiones del primer cromosoma, proporcionando así una estimación de la cantidad relativa de ADN correspondiente a

la primera y segunda regiones del primer cromosoma en la muestra.

En cualquier realización, el primer cromosoma es el cromosoma 21 y el segundo cromosoma se selecciona entre el cromosoma 13 y el cromosoma 18.

En cualquier realización, cada uno de los productos circulares no covalentes comprende un fragmento de ADN de la muestra. En estas realizaciones, las sondas de la etapa a) pueden comprender:

- i. una secuencia de la cabeza y una secuencia de la cola, en donde las secuencias de la cabeza y la cola están en los extremos de una primera molécula de oligonucleótido; y
- ii. una secuencia de cabestrillo que comprende, en orden:

una secuencia de flanqueo secuencia arriba que es complementaria a la secuencia principal;  
una secuencia complementaria diana que es complementaria a un fragmento diana; y  
una secuencia de flanqueo secuencia abajo que es complementaria a la secuencia de la cola;  
y, en los productos circulares no covalentes, los extremos del fragmento diana son ligables adyacentes a los extremos de las secuencias de la cabeza y la cola en la primera molécula de oligonucleótido.

En estas realizaciones, la secuencia de cabestrillo puede estar en la primera molécula de oligonucleótido. Alternativamente, la secuencia de cabestrillo puede estar en una segunda molécula de oligonucleótido.

En cualquier realización, la muestra se puede digerir con una enzima de restricción.

En cualquier realización, la muestra comprende ADN genómico, por ejemplo, ADN libre de células aislado de sangre.

En cualquier realización, la muestra puede comprender ADN libre de células aislado del torrente sanguíneo de una humana embarazada.

En cualquier realización, el cromosoma se puede aislar de una biopsia de tejido.

En cualquier realización, el cromosoma puede ser un cromosoma microbiano.

En cualquier realización, la etapa de cuantificación se puede realizar separando las moléculas individuales del producto de amplificación en círculo rodante producidas en la etapa c) entre sí, y contando el número de moléculas individuales del producto de amplificación en círculo rodante en un área o volumen definido.

En estas realizaciones, la etapa de cuantificación se puede realizar mediante:

- i. hibridar un oligonucleótido marcado con las moléculas del producto RCA, en el que el oligonucleótido marcado se hibrida con una secuencia que se repite en el producto RCA, produciendo así una pluralidad de complejos que comprenden cada uno de ellos un único producto RCA y una pluralidad de oligonucleótidos marcados que se hibridan con el producto RCA; y
- ii. contar el número de complejos marcados.

En estas realizaciones, la etapa de cuantificación se puede realizar mediante:

- (a) obtener un sustrato que comprende los complejos marcados distribuidos sobre la superficie del sustrato; y
- (b) contar el número de productos RCA que están presentes en la primera área del sustrato.

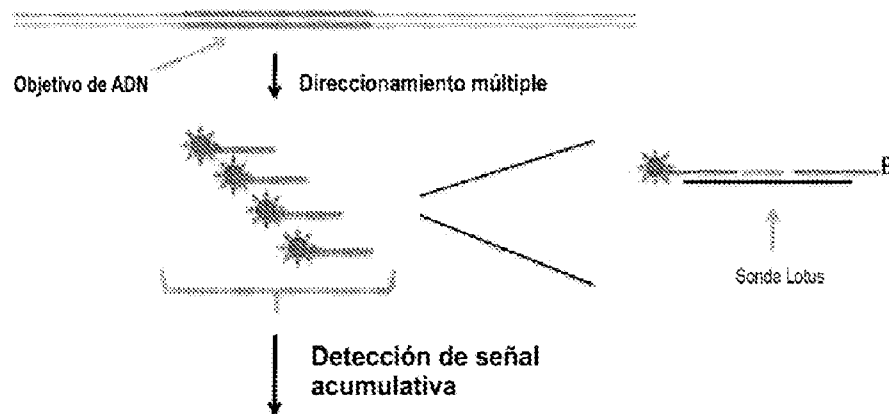
En estas realizaciones, el método puede comprender:

- (a) obtener un sustrato que comprende una primera y una segunda pluralidad de complejos distribuidos en la superficie del sustrato, en donde cada uno de los complejos comprende un único producto RCA y una pluralidad de sondas oligonucleotídicas marcadas que se hibridan con el producto RCA, la primera y las segundas pluralidades de complejos están marcadas de manera distinguible, y la primera y segunda pluralidades de complejos corresponden a cromosomas diferentes; y
- (b) contar el número de la primera pluralidad de productos RCA e, independientemente, contar el número de la segunda pluralidad de productos RCA, que están presentes en la primera área del sustrato. En esta realización, los oligonucleótidos pueden estar marcados con fluorescencia.

En estas realizaciones, el primer conjunto de sondas puede comprender al menos 50 sondas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar productos de amplificación en círculo rodante (RCA), comprendiendo el método:
- 5 (a) marcar los productos RCA;  
(b) distribuir los productos RCA marcados sobre la superficie de un sustrato, en el que cada uno de los productos RCA marcados comprende:
- 10 (i) un producto RCA,  
(ii) un único producto de ligadura circularizada, y  
(iii) una pluralidad de oligonucleótidos marcados que se hibridan con una secuencia que se repite en el producto RCA;  
y
- 15 (c) contar el número de productos RCA marcados que están presentes en un área del sustrato, en el que el sustrato comprende múltiples conjuntos de productos RCA que están marcados de manera distinguible antes de distribuirse sobre el sustrato y en el que cada conjunto de productos RCA tiene una secuencia repetida distinguible y los oligonucleótidos marcados que se hibridan con los mismos están marcados de manera distinguible para cada conjunto de productos RCA.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que los múltiples conjuntos de productos RCA distinguibles comprenden un conjunto de productos RCA correspondientes al cromosoma 18 humano y un conjunto de productos RCA correspondientes al cromosoma 21 humano.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que:
- distribuir los productos RCA marcados sobre la superficie del sustrato comprende además:
- distribuir primera y segunda pluralidades de productos RCA marcados sobre la superficie del sustrato, en el que:
- 30 (i) la primera y segunda pluralidad de complejos están marcadas de manera distinguible, y  
(ii) la primera y segunda pluralidad de complejos corresponden a cromosomas diferentes.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la primera y segunda pluralidad de productos RCA marcados están marcados de forma fluorescente.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, en el que el producto de ligadura circularizada comprende un fragmento de ADN<sub>g</sub> de la sangre de una mujer embarazada.



**FIG. 1**

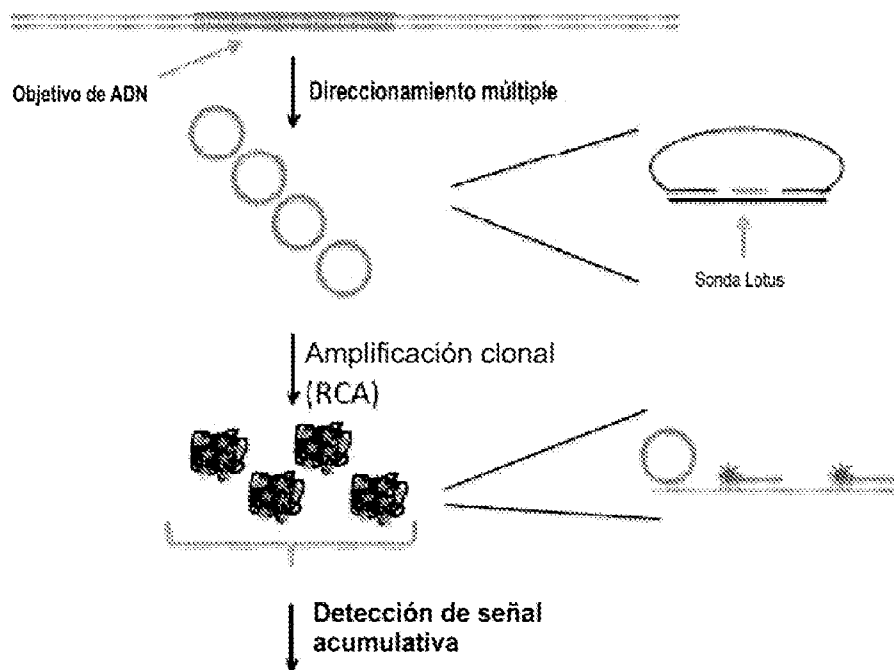
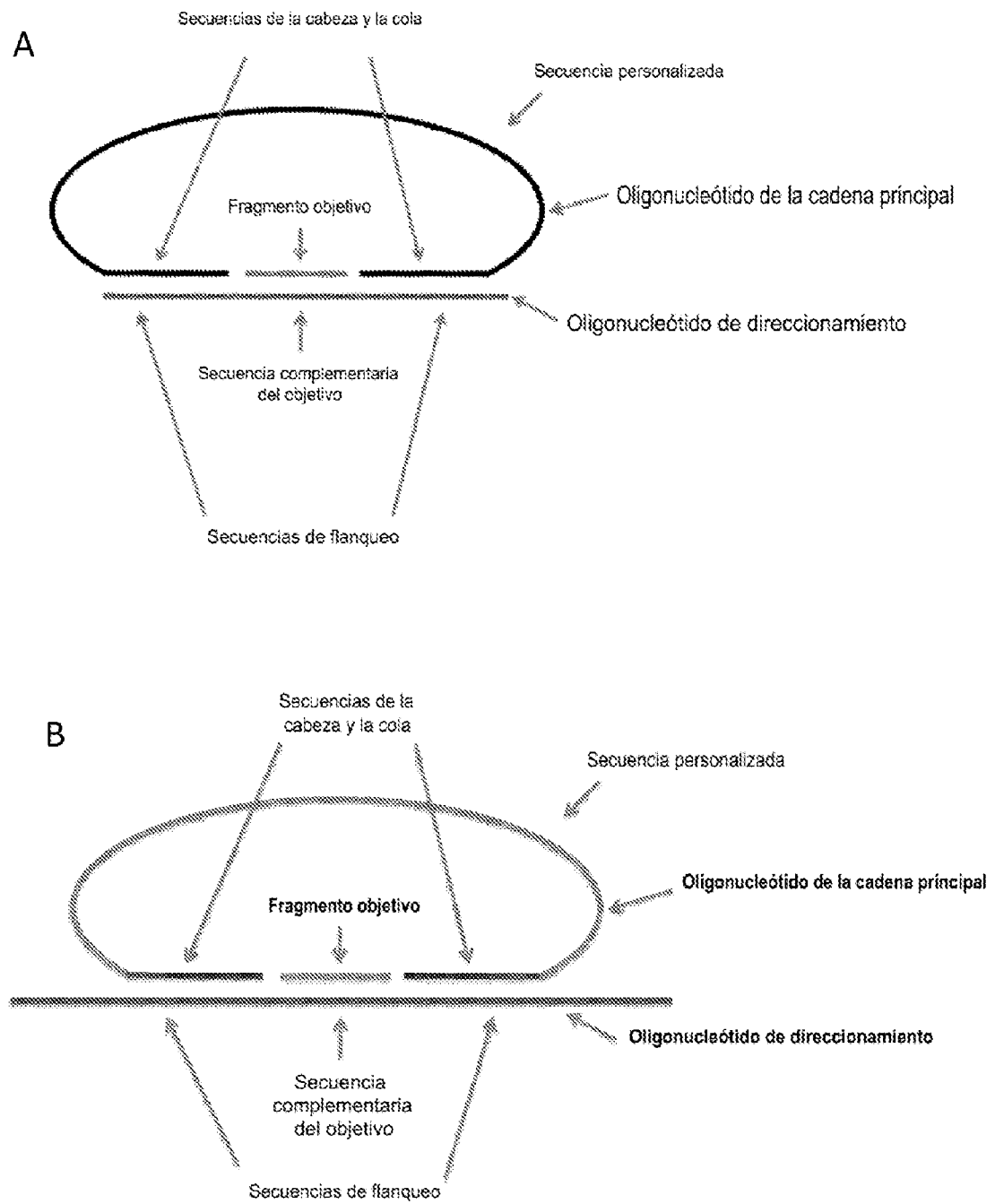
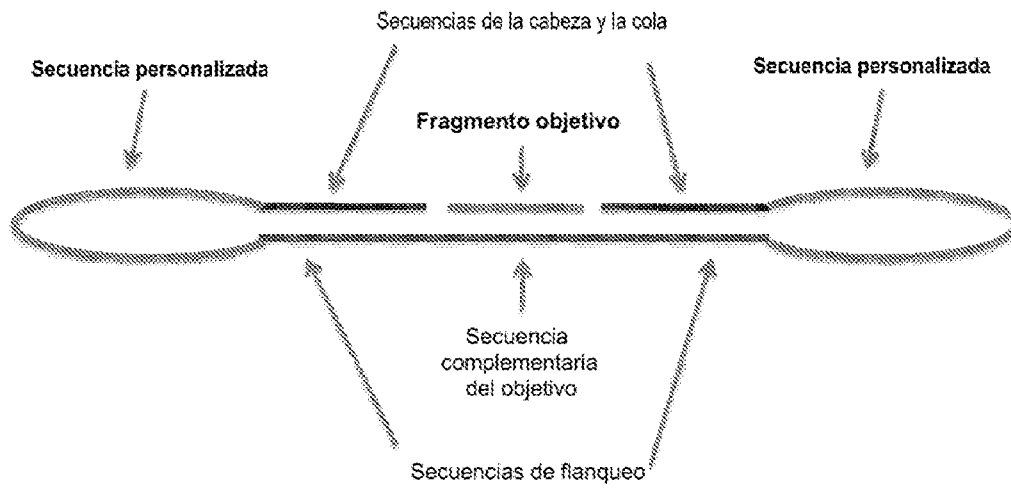


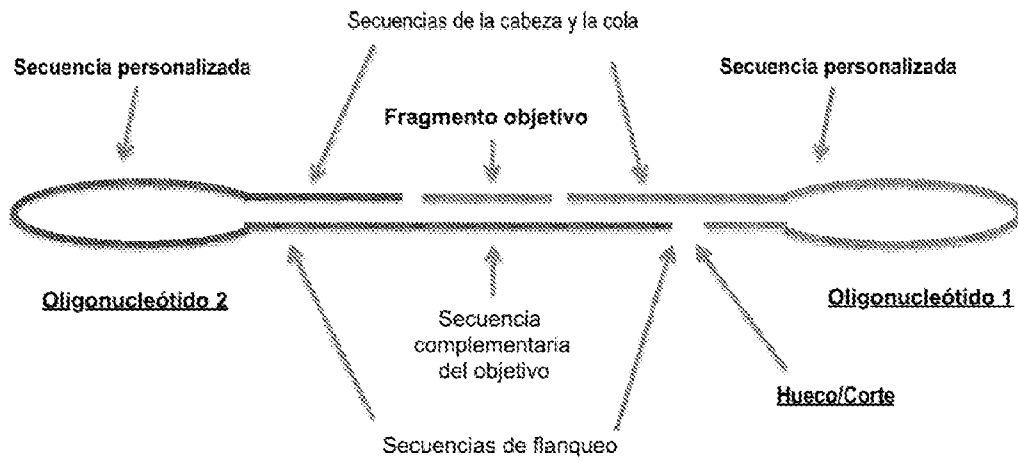
FIG. 2



**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



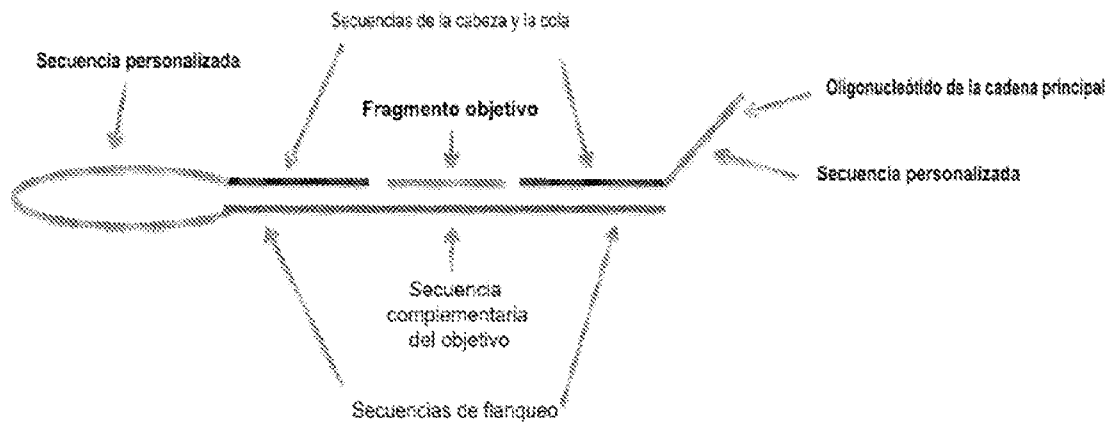


FIG. 6

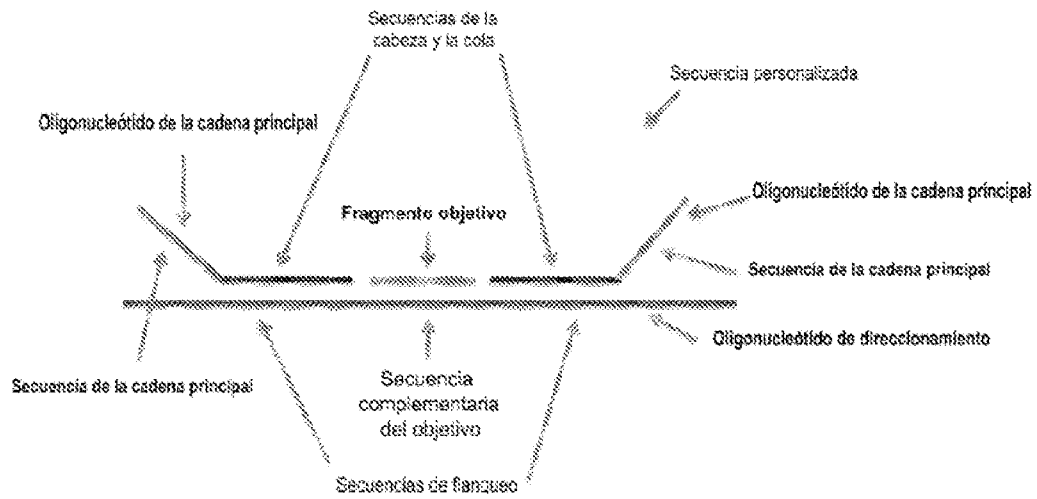


FIG. 7

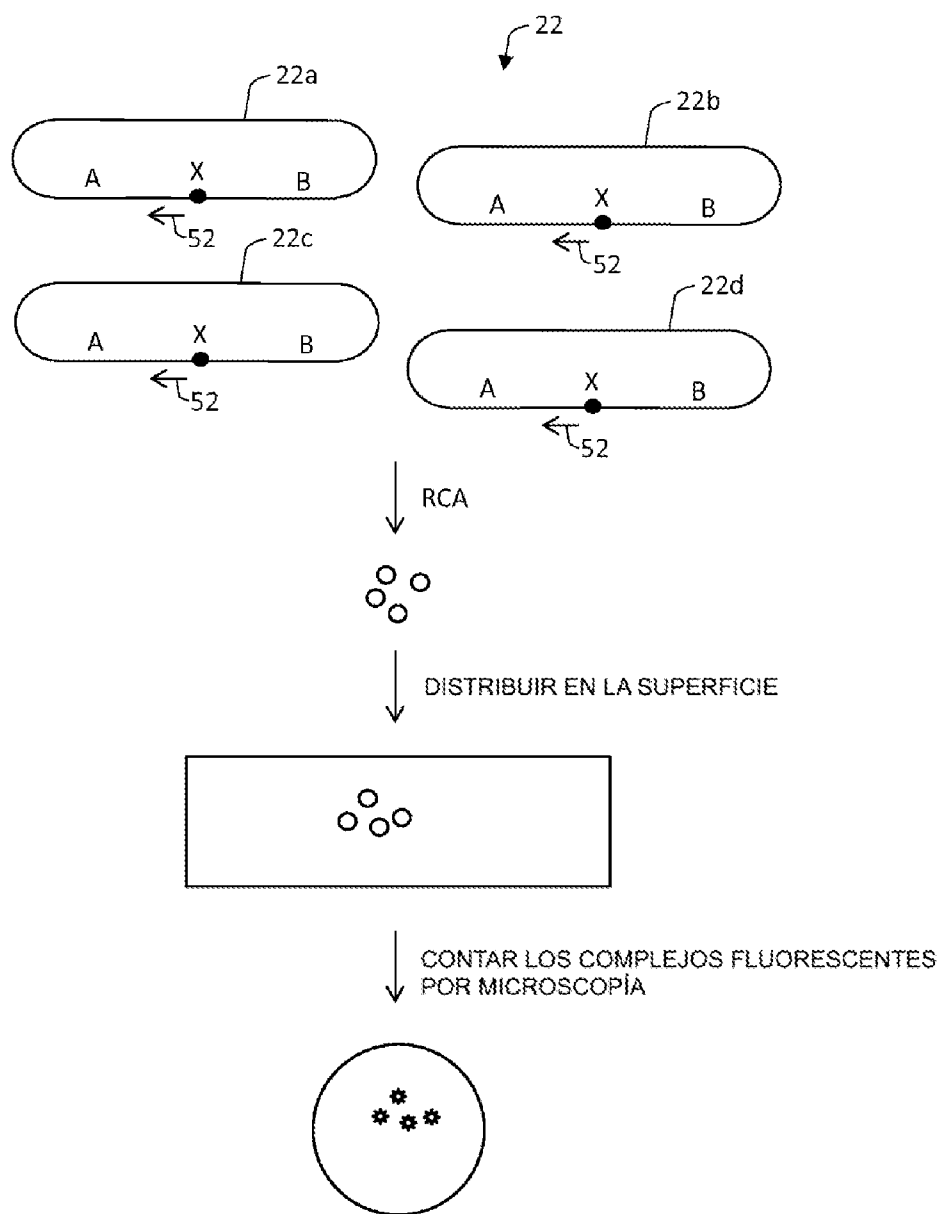


FIG. 8

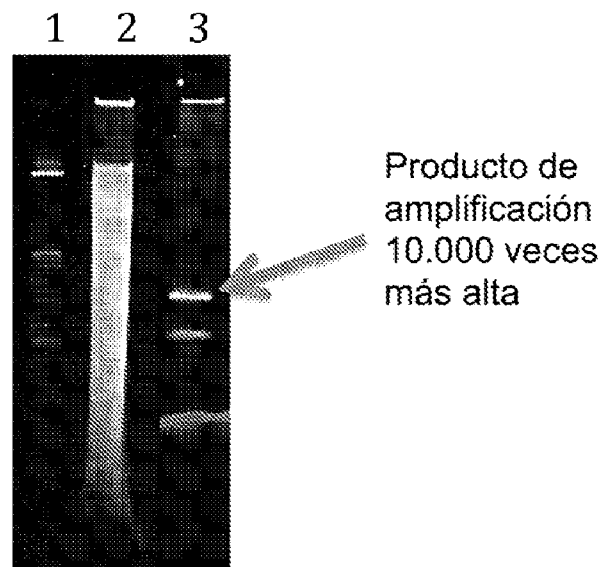


FIG.

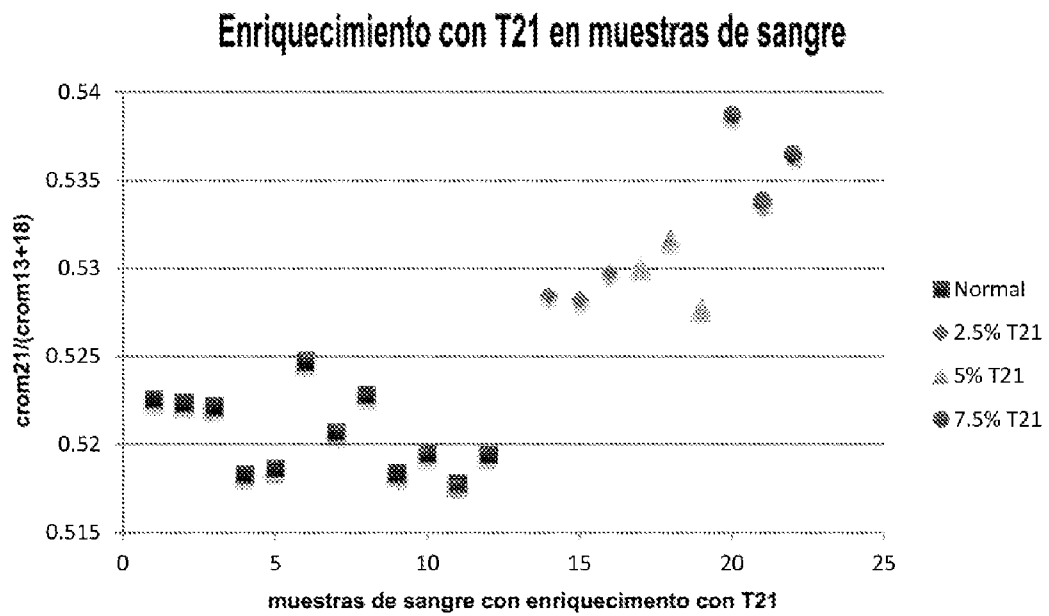


FIG. 10

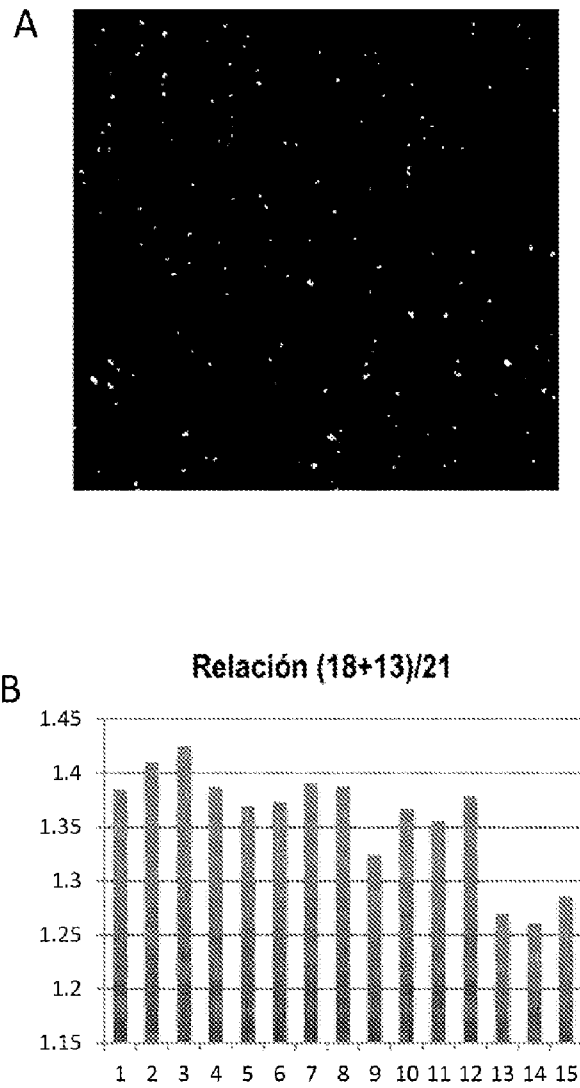


FIG. 11