



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 603**

51 Int. Cl.:  
**C07H 21/02** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02763230 .6**  
96 Fecha de presentación : **03.07.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1448581**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Métodos de detección y cuantificación de analitos en mezclas complejas.**

30 Prioridad: **03.07.2001 US 898743**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **The Institute for Systems Biology  
1441 North 34th Street  
Seattle, Washington 98103-8904, US**

72 Inventor/es: **Dimitrov, Krassen y  
Dunaway, Dwayne**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 316 603 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**

Métodos de detección y cuantificación de analitos en mezclas complejas.

**5 Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere, en general, al campo de la genómica y, de forma más específica, a la detección, identificación y cuantificación de analitos diana en mezclas.

10 Aunque todas las células del cuerpo humano contienen el mismo material genético, los mismos genes no están activos de todas esas células. Las alteraciones en los patrones de expresión de genes pueden tener profundos efectos sobre las funciones biológicas. Estas variaciones de la expresión de genes se hallan en el centro de los procesos fisiológicos y patológicos alterados. Por lo tanto, la identificación y cuantificación de la expresión de genes en células normales, comparadas con células enfermas, puede contribuir al descubrimiento de nuevas dianas medicamentosas y diagnósticas.

15 Los ácidos nucleicos pueden ser detectados y cuantificados sobre la base de sus secuencias de polinucleótidos específicas. El principio básico subyacente a estos métodos existentes de detección y cuantificación es la hibridación de una secuencia de sonda complementaria marcada con una secuencia diana de interés en una muestra. La formación de un híbrido indica la presencia de la secuencia diana en la muestra, y el grado de formación del híbrido, medido por la cantidad de marca incorporada en el mismo, es proporcional a la cantidad de la secuencia diana.

20 Esta técnica, denominada hibridación molecular, ha sido un instrumento útil para identificar y analizar secuencias de ácidos nucleicos específicas en mezclas complejas. Esta técnica se ha utilizado en diagnósticos, por ejemplo, para detectar secuencias de ácidos nucleicos de diversos microorganismos en muestras biológicas. Adicionalmente, se han utilizado técnicas de hibridación para realizar el mapeado de diferencias genéticas o polimorfismos entre individuos. Además, estas técnicas se han usado para monitorizar variaciones de la expresión de genes en diferentes poblaciones de células o en células tratadas con diferentes agentes.

30 En el pasado, sólo era posible detectar unos pocos genes simultáneamente en una muestra compleja. Sin embargo, las micromatrices de ADN, dispositivos consistentes en miles de secuencias de ADN inmovilizadas, presentes en una superficie miniaturizada, han hecho que este procedimiento sea más eficiente. Con el uso de una micromatriz es posible detectar, en un único experimento, la presencia o ausencia de millares de genes en una muestra biológica. Esto permite a los investigadores llevar a cabo simultáneamente varios ensayos diagnósticos sobre una muestra, u observar cambios de los niveles de expresión en millares de genes en un experimento. Por lo general, las micromatrices se preparan uniendo secuencias de ADN a una superficie tal como una membrana de nailon o una lámina de vidrio en localizaciones definidas con precisión sobre una cuadrícula. A continuación, se marcan e hibridan los ácidos nucleicos en una muestra biológica en la matriz. El ADN marcado de la muestra determina la posición exacta en la matriz en donde se produce hibridación, permitiendo la detección automática.

40 Desgraciadamente, a pesar de la miniaturización de los formatos de matriz, este método exige todavía cantidades importantes de la muestra biológica. Sin embargo, en numerosos casos tales como biopsias de tejidos enfermos o muestras de un tipo de células discretas, la muestra biológica está disponible en una cantidad limitada. Además, la cinética de hibridación en la superficie de una micromatriz es menos eficaz que la hibridación en pequeñas cantidades de solución acuosa. Adicionalmente, las micromatrices requieren un gran intervalo dinámico de detección para exponer una diferencia importante en presencia de abundantes especies moleculares diferentes. La consecuencia es un descenso de la sensibilidad, puesto que se establece un compromiso entre sensibilidad e intervalo dinámico. Un problema adicional que se presenta con los métodos basados en micromatrices es que el rendimiento es cuantitativamente análogo a los datos que han sufrido varias transformaciones intermedias. En las micromatrices, la cantidad de ácido nucleico hibridado en cada punto se determina midiendo su marca y, de esta forma, cualquier correlación no lineal entre la cantidad de ADN hibridado y la cantidad de marca detectada determinará un sesgo en la obtención de datos. Esta ausencia de linealidad ha sido extensamente documentada.

55 Collins *et al.* (*Nucleic Acids Research* 25(15): 2979-2984 (1997)) describen oligonucleótidos específicos para dianas, denominados extensores de marca, que incluyen una extensión no dianizada que se une con un amplificador que, a su vez, se une a varios amplificadores para generar una amplificación de la señal; la misma marca se une a todos los extensores de marca, en donde la detección se basa en la inmovilización (localización por inmovilización). El método descrito por Collins *et al.* no provee una amplificación de señal simultánea (multiplexación) para la detección directa de ácidos nucleicos, en particular cuando están presentes en mezclas complejas.

60 Por lo tanto, existe la necesidad de una detección, identificación y cuantificación exacta y sensible de los analitos en mezclas complejas. La presente invención satisface esta demanda y ofrece, asimismo, ventajas asociadas.

**Resumen de la invención**

65 La invención ofrece una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva, que contiene aproximadamente treinta o más sondas de ácidos nucleicos específicas para dianas, cada una unida a una marca única, fijada a un ácido nucleico. También se ofrece un método para detectar un analito de ácido nucleico. El método consiste en (a) poner en

contacto una mezcla de analitos de ácidos nucleicos con la población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva de la invención, bajo condiciones suficientes para la hibridación de las sondas con los analitos de ácido nucleico diana; (b) medir la señal resultante de una o varias de las sondas específicas para la diana, hibridadas con un analito, en donde la señal identifica de manera inequívoca el analito.

5

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra los componentes de un especificador. Figura 1A muestra una asociación entre una diana y un especificador marcado. Figura 1B muestra la estructura de un *genedigit*. Figura 1C muestra una asociación entre un *genedigit* y anti-*genedigit* marcado.

10

Figura 2 muestra una molécula de sonda de ADN (*especificador*) que contiene varios tipos diferentes de marcas espacialmente separadas.

15

Figura 3 muestra moléculas de sonda de ADN que contienen una marca en un extremo, que han sido estiradas sobre un cubre-objeto usando una técnica de flow-stretch.

20

Figura 4 muestra moléculas de sonda de ADN que han sido alineadas usando una técnica de electro-stretch. Figura 4A muestra moléculas de sonda de ADN marcadas en una célula de flujo con el voltaje apagado. Figura 4B muestra las moléculas de sonda de ADN marcadas en una célula de flujo con el voltaje encendido.

Figura 5 muestra un esquema de sondas alineadas por constricción en el flujo de un líquido que contiene las sondas, en presencia de un campo eléctrico oscilante.

25

### Descripción detallada de la invención

Esta invención está dirigida a una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva, que comprende treinta o más sondas de ácido nucleico específicas para la diana, cada una de ellas unida a una marca exclusiva unida con un ácido nucleico, en donde cada sonda de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que comprende una región específica para la diana y una región que comprende *genedigits*, en donde estos *genedigits* son regiones de ácido nucleico de secuencias nucleotídicas predeterminadas que se encuentran unidas específicamente por secuencias nucleotídicas anti-*genedigit* complementarias, en donde cada una de dichas secuencias nucleotídicas anti-*genedigit* está unida a un monómero de marca o a una combinación de monómeros de marca, en donde la población está en solución, y en donde la marca tiene una señal detectable que es fluorescencia, luminiscencia, colorimétrica, de voltaje, corriente o un campo magnético que se puede usar para la detección, identificación y cuantificación directa de una amplia variedad de analitos diana. La población diversa es ventajosa porque proporciona un número elevado de marcas únicas de aproximadamente la misma señal unitaria, a partir sólo de un número reducido de marcas diferentes. Se proporcionan marcas suficientes, de forma que cada analito en una mezcla compleja puede unirse de manera única con una marca y ser identificado de este modo. Las marcas están diseñadas de tal forma que pueden ser usadas en un pequeño volumen de solución, lo que incrementa la eficacia de la reacción de unión, y lo cual es de utilidad cuando se dispone para el análisis de sólo cantidades reducidas de la muestra. Después de identificar las moléculas individuales en una muestra, es posible realizar un recuento directo de las mismas, lo que da como resultado una lectura digital de cada especie molecular en una mezcla. Dado que las diversas marcas están basadas en un número reducido de marcas iniciales, esto permite que el método de detección opere dentro de un estrecho intervalo dinámico, con la consecuencia de una mejora de la sensibilidad del sistema, puesto que se evita el compromiso entre sensibilidad e intervalo dinámico. Por lo tanto, los métodos de la invención proporcionan un sistema exacto y sensible para la detección, identificación y cuantificación de analitos en una mezcla.

En una realización, la invención se dirige a la detección de analitos de ácido nucleico en una mezcla compleja mediante, en primer lugar, hacer contactar la población diversa de sondas según la invención bajo condiciones suficientes para la hibridación de las sondas con los analitos de ácido nucleico diana. Estas sondas de ácido nucleico específicas para la diana, denominadas especificadores, contienen una región específica para la diana y una región que contiene una o múltiples secuencias "*genedigit*" exclusivas. Los *genedigits* son regiones de ácido nucleico de secuencias nucleotídicas predeterminadas, unidas específicamente por secuencias nucleotídicas anti-*genedigit* complementarias, en donde cada una de dichas secuencias nucleotídicas anti-*genedigit* está unida a un monómero de marca o a una combinación de monómeros de marca, en donde la marca tiene una señal detectable que es fluorescencia, luminiscencia, colorimétrica, de voltaje, corriente o un campo magnético.

Como se usa en este documento, el término "unido", cuando se refiere a una marca exclusiva o un ácido nucleico, significa que un monómero de marca está unido a un nucleótido en una correspondencia 1:1. Un monómero de marca, tal como se usa en este documento, significa un resto mensurable individual, tal como un radioisótopo, fluorocromo, tinción, enzima, nanopartícula, marca quimiofluorescente, biotina, u otro resto conocido en la técnica, que es mensurable por métodos analíticos. Un monómero de marca puede unirse directamente a un nucleótido usando métodos bien conocidos en la técnica. Los nucleótidos pueden ser también modificados o derivatizados químicamente para fijar un monómero de marca. Por ejemplo, un monómero fluorescente tal como una molécula de fluoresceína puede unirse a dUTP (trifosfato de desoxiuridina) usando un grupo aminoalquilo de cuatro átomos. Cada monómero de marca se fija a un nucleótido, formando un complejo monómero de marca:nucleótido. Este monómero de marca:nucleótido puede incorporarse en ácidos nucleicos de muy diversas formas. Por ejemplo, se puede incorporar un monómero de

65

## ES 2 316 603 T3

marca:nucleótido en una sola localización dentro de un ácido nucleico o en dos o múltiples localizaciones dentro de un ácido nucleico. Es posible unir, en primer lugar, un nucleótido a un monómero de marca, e incorporarlo entonces en un ácido nucleico, o se puede marcar un ácido nucleico existente uniendo un monómero de marca a un nucleótido dentro del ácido nucleico. Adicionalmente, por ejemplo, se puede incorporar un monómero de marca:nucleótido en un ácido nucleico y se puede incorporar un tipo diferente de monómero de marca:nucleótido en el mismo ácido nucleico.

Como se usa en este documento, “analito” o diana, cuando se refiere a un analito, significa cualquier molécula de ácido nucleico cuya presencia se mide. Una molécula de analito de ácido nucleico puede ser, básicamente, cualquier molécula de ácido nucleico para la que existe una sonda o ensayo detectable, o puede ser producida por un experto en la técnica. La medición puede ser cuantitativa o cualitativa. Un analito puede formar parte de una muestra que contiene otros componentes, o puede ser el único o principal componente de la muestra. Por lo tanto, un analito puede ser un componente de una célula o tejido completo, un extracto de célula o tejido, un lisado fraccionado de los mismos, o una molécula sustancialmente purificada. El analito puede estar unido en solución o en fase sólida, incluida, por ejemplo, una superficie sólida tal como un chip, micromatriz o perla. Asimismo, el analito puede tener una estructura o secuencia conocida o desconocida.

Como se usa en este documento, la expresión “específico para la diana” significa un agente que se fija selectivamente a un analito diana. Este agente se unirá, con afinidad preferencial, con la diana, exhibiendo al mismo tiempo escasa o nula reactividad cruzada con otras moléculas. Por ejemplo, cuando la diana es un ácido nucleico, una secuencia específica para la diana es aquella que es complementaria para la secuencia de la diana, y es capaz de hibridar con la secuencia diana, con escasa o nula reactividad cruzada frente a otras moléculas de ácido nucleico. Una diana de ácido nucleico puede ser fijada, asimismo, de manera específica para la diana por una proteína, por ejemplo, el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción.

El término “complementario” se refiere a dos nucleótidos que pueden formar múltiples interacciones termodinámicamente favorables entre sí. Por ejemplo, la adenina es complementaria a la timina, ya que pueden formar dos enlaces de hidrógeno. De manera similar, guanina y citosina son complementarias, puesto que pueden formar tres enlaces de hidrógeno. Una secuencia nucleotídica es el complemento de otra secuencia nucleotídica si los nucleótidos de la primera secuencia son complementarios a los nucleótidos de la segunda secuencia. El porcentaje de complementariedad (es decir, cuántos nucleótidos de una cadena forman múltiples interacciones termodinámicamente favorables con la otra cadena, en comparación con el número total de nucleótidos presentes en la secuencia) indica el grado de complementariedad de dos secuencias.

Como se usa en este documento, la expresión “secuencia repetida” significa dos o múltiples copias de un elemento central. Una secuencia repetida puede tener una repetición directa de la secuencia central sin que intervenga ninguna otra secuencia, o la secuencia repetida puede tener una repetición no consecutiva del elemento central con secuencias de intervención. Un elemento central puede estar constituido por ácidos nucleicos tales como un oligonucleótido o un aptámero. Por ejemplo, si el elemento central es una secuencia de ácidos nucleicos de 8 pares de bases, entonces tres repeticiones directas de esta secuencia serían una secuencia de 24 bases. Una “secuencia repetida complementaria” es una secuencia que se une específicamente a la secuencia de repetición. Para el ejemplo anterior, en el que la secuencia de repetición es la repetición de un elemento central de ácido nucleico, la secuencia de repetición complementaria puede contener una o múltiples copias de la cadena complementaria del elemento central, que hibridarán específicamente con la secuencia de repetición.

Como se usa en este documento, el término “*genedigit*” significa una región de una secuencia nucleotídica predefinida que sirve como punto de unión para una marca. El *genedigit* puede tener cualquier estructura, incluyendo, por ejemplo, una secuencia exclusiva única o una secuencia que contiene elementos centrales repetidos. Cada *genedigit* posee una secuencia exclusiva que lo diferencia de otros *genedigits*. Un “anti-*genedigit*” es una secuencia o estructura nucleotídica que se une específicamente con el *genedigit*. Por ejemplo, si el *genedigit* es un ácido nucleico, el anti-*genedigit* puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria para la secuencia del *genedigit*. Si el *genedigit* es un ácido nucleico que contiene elementos centrales repetidos, entonces el anti-*genedigit* puede ser una serie de secuencias repetidas que son complementarias para las secuencias repetidas en el *genedigit*. Un anti-*genedigit* puede contener el mismo número, o un número menor de secuencias repetidas comparado con el *genedigit*, con la condición de que el anti-*genedigit* sea capaz de unirse específicamente con el *genedigit*.

Como se usa en este documento, el término “*especificador*” significa el enlace de uno o múltiples *genedigits* a una secuencia diana específica. Los *genedigits* pueden estar unidos directamente, o se pueden enlazar usando una secuencia interventora o adaptativa. Un *especificador* puede contener una secuencia diana específica que le permitirá unirse a un analito diana. Un “anti-*especificador*” tiene una secuencia complementaria para la totalidad o parte del *especificador*, de manera que se une específicamente con el *especificador*.

Como se usa en este documento, el término “mezcla” significa una composición que contiene más de una molécula. Una mezcla puede ser homogénea, si contiene una única especie, o heterogénea, cuando contiene diferentes especies. Ejemplos de muestras homogéneas incluyen, por ejemplo, poblaciones aisladas de ácidos nucleicos. Las mezclas heterogéneas incluyen extractos de tejidos, células, lisados y porciones fraccionadas de los mismos.

Como se usa en este documento, el término “marca” significa una molécula o moléculas que tornan un analito detectable por medio de un método analítico. Una marca apropiada depende del formato particular del ensayo, y son

bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una marca específica para una molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ácido nucleico complementaria unida a un monómero de marca o resto mensurable tal como un radioisótopo, fluorocromo, tinción, enzima, nanopartícula, marca quimioluminiscente, biotina u otro resto conocido en la técnica, y que es mensurable por métodos analíticos. Adicionalmente, una marca puede inducir cualquier combinación de monómeros de marca.

Como se usa en este documento, “exclusivo”, cuando se usa en referencia a la marca, significa una marca que posee una señal detectable que la distingue de otras marcas en la misma mezcla. Por lo tanto, una marca exclusiva es un término relativo, ya que depende de otras marcas que se hallan presentes en la mezcla, y de la sensibilidad del equipo de detección utilizado. En el caso de una marca fluorescente, una marca exclusiva es una marca que posee propiedades espectrales que la diferencian de manera significativa de otras marcas fluorescentes en la misma mezcla. Por ejemplo, una marca de fluoresceína puede ser una marca exclusiva si está incluida en una mezcla que contiene una marca de rodamina, dado que estas marcas fluorescentes emiten luz a longitudes de onda diferentes que básicamente no se solapan. Sin embargo, si se agregara a la mezcla otra marca fluorescente que emitiera luz a una longitud de onda igual o muy similar a la de fluoresceína, por ejemplo, el fluoróforo Verde Oregón, entonces la fluoresceína dejaría de ser una marca exclusiva, puesto que el Verde Oregón y la fluoresceína no se podrían distinguir entre sí. Igualmente, una marca es exclusiva en relación con la sensibilidad del equipo de detección utilizado. Por ejemplo, se puede usar un dispositivo FACS para detectar los picos de emisión de diferentes marcas que contienen fluoróforo. Si un conjunto determinado de marcas tiene picos de emisión separados, por ejemplo, por 2 nm, estas marcas no serían exclusivas si se detectaran en un dispositivo FACS capaz de distinguir picos separados por 10 nm o más, pero sí serían exclusivas si se detectasen en un dispositivo FACS capaz de distinguir picos separados por 1 nm o más.

Como se usa en este documento, el término “señal” significa una cantidad o impulso físico, detectable, por el que se puede obtener información sobre la presencia de un analito. Por lo tanto, una señal es la lectura de un componente mensurable de detección. Una señal incluye, por ejemplo, fluorescencia, luminiscencia, colorimétrica, densidad, imagen, sonido, voltaje, corriente, campo magnético y masa. Por lo tanto, la expresión “señal unitaria”, tal como se usa en este documento, significa una cantidad especificada de una señal en cuyos términos se pueden establecer las magnitudes de otras cantidades de señales del mismo tipo. El equipo de detección puede contar señales del mismo tipo y mostrar la cantidad de la señal en términos de una unidad común. Por ejemplo, un ácido nucleico puede estar marcado radiactivamente en una posición nucleotídica, y otro ácido nucleico puede estar marcado radiactivamente en tres posiciones nucleotídicas. Las partículas radiactivas emitidas por cada ácido nucleico se pueden detectar y cuantificar, por ejemplo, en un contador de gammagrafía, que las muestra como número de cuentas por minuto (cpm). El ácido nucleico marcado en tres posiciones emitirá aproximadamente el triple de partículas radiactivas que el ácido nucleico marcado en una posición y, por consiguiente, se registrará un número de cpm aproximadamente tres veces mayor.

Como se usa en este documento, el término “dendrímico” significa un ácido nucleico ramificado. Estas estructuras están formadas por capas de ácidos nucleicos, en donde cada capa está compuesta por heterohíbridos de cadena parcialmente simple, llamados monómeros de dendrímico. La capa más externa de un dendrímico determinado puede tener múltiples brazos de cadena simple capaces de hibridar con una secuencia de ácidos nucleicos complementaria. Los monómeros de dendrímico tienen la propiedad de que la adición secuencial de monómeros da lugar a una estructura tridimensional, compuesta por ácido nucleico. Distintas configuraciones de moléculas de ácido nucleico pueden dar origen a un elevado número de estructuras dendríticas de diferentes formas. Por ejemplo, con el uso de sintones dendrímicos disponibles en el comercio es posible sintetizar un dendrímico con 1 tallo y 81 ramas. Igualmente, es posible formar estructuras en forma de tridente, de peine y de burbuja.

Como se usa en este documento, la expresión “ácido nucleico” significa una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla o doble que incluye, por ejemplo, ADN genómico, ADNc y ARNm. La expresión quiere incluir moléculas de ácido nucleico de origen tanto sintético como natural. Una molécula de ácido nucleico de la invención puede tener una configuración lineal, circular o ramificada, y puede representar la cadena con sentido o antisentido, o ambas de una molécula nativa de ácido nucleico. Adicionalmente, una molécula de ácido nucleico puede incorporar un resto detectable tal como una marca radiactiva, un fluorocromo, una sustancia ferromagnética, una marca luminiscente o un resto detectable tal como biotina.

Como se usa en este documento, el término “hibridar” significa unir diferentes componentes entre sí. Se puede unir cualquier número de componentes, por ejemplo, es posible unir dos componentes entre sí para formar un híbrido (dúplex), tres componentes para formar un tríplex, etc. Los ácidos nucleicos pueden formar un híbrido o dúplex, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno entre nucleótidos complementarios. La formación de híbridos de ácido nucleico depende de varias condiciones conocidas en la técnica, incluidas temperatura, concentración salina y pH.

Como se usa en este documento, “complejidad” se refiere al grado de elementos repetidos entre dos ácidos nucleicos que están hibridando entre sí en una solución (véase Anderson, M.L.M., *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag, Nueva York (1999)). Cuando las moléculas de ácido nucleico que deben hibridar contienen elementos centrales repetidos o regiones homopolímeras, existen muchas oportunidades posibles de apareamiento y, de este modo, la hibridación transcurre rápidamente. Cuando las moléculas de ácido nucleico que deben hibridar no contienen ningún elemento central repetido, existe entonces una sola forma para que las dos secuencias puedan hibridar, y de esta forma, la hibridación tiene lugar con mayor lentitud. Se dice que las secuencias que hibridan rápidamente tienen baja complejidad, en tanto que las secuencias que tardan más en hibridar tienen una complejidad mayor. Por ejemplo, una secuencia de *genedigit* de 40 pares de bases, formada por cinco repeticiones directas de un elemento central de 8 pares

de bases, puede hibridar con un anti-*genedigit* de 24 pares de bases que contiene tres repeticiones de la repetición central de 8 pares de bases en tres registros diferentes (véase, por ejemplo, la Figura 1C). De este modo, el anti-*genedigit* puede hibridar con el *genedigit* de 40 pares de bases a través de una secuencia de 24 pares de bases que sólo tiene una complejidad de una secuencia de 8 pares de bases.

La invención ofrece una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva, que proporciona un número elevado de marcas exclusivas de aproximadamente la misma señal unitaria, a partir de tan sólo un número reducido de marcas diferentes. Se ofrecen marcas suficientes de manera que cada analito en una mezcla compleja pueda ser unido exclusivamente por una marca y, de esta forma, ser identificado. Estas marcas se pueden utilizar en volúmenes muy pequeños, lo que mejora la cinética en la reacción de unión. Además, el diseño de estas marcas permite una exactitud mejorada en la detección.

Puede ser deseable una amplia diversidad de marcas exclusivas para proporcionar una marca única a cada especie en una mezcla compleja. La invención ofrece métodos para combinar diferentes marcas en proporciones predeterminadas para generar una extensa diversidad de marcas exclusivas. Las marcas están diseñadas de manera modular, lo que permite flexibilizar el número de marcas exclusivas generadas. Por ejemplo, si se utiliza un número elevado de módulos, resulta posible un alto número de proporciones de las diferentes marcas, lo cual da lugar a un alto número de marcas exclusivas. El número de marcas generadas se puede ajustar para cubrir mezclas con cantidades diferentes de especies.

La invención ofrece una población diversa de marcas que contiene treinta o más marcas exclusivas, en donde cada marca exclusiva está unida a un ácido nucleico. Una población diversa de marcas es una mezcla de distintas especies de marcas. Esta población puede tener desde sólo aproximadamente treinta especies de marcas diferentes hasta  $10^{17}$  especies de marcas distintas. El número real de moléculas de cada especie de marca puede variar, con la condición de que haya presente al menos una molécula de la especie de marca. Además, la invención proporciona una población diversa de marcas que contiene 40, 60, 80, 100, 120, 140 o aproximadamente 160 marcas exclusivas. Una porción de esta población puede estar formada por diferentes monómeros de marca individuales. La invención proporciona igualmente marcas exclusivas, compuestas por combinaciones de diferentes marcas, lo que puede incrementar sustancialmente el número de marcas exclusivas.

Las marcas de la invención se unen a ácidos nucleicos. En particular, las marcas se unen a los ácidos nucleicos a través de la unión de un monómero de marca con un nucleótido en el ácido nucleico en una correspondencia 1:1. Un ácido nucleico puede contener varios monómeros de marca, si bien cada monómero de marca está unido directamente a un nucleótido.

Un monómero de marca puede estar unido a cualquier nucleótido, incluyendo nucleótidos tanto naturales como no naturales. Un nucleótido contiene tres partes, un grupo fosfato, una molécula de pentosa, azúcar de cinco carbonos, y una base orgánica. En el ARN, la pentosa es ribosa y en el ADN, es desoxirribosa y, de este modo, los nucleótidos para la incorporación en el ARN se denominan ribonucleótidos y los nucleótidos para la incorporación en el ADN se denominan desoxirribonucleótidos. Tanto en el ADN como en el ARN se encuentran tres bases, adenina, guanina y citosina, mientras que la timina se halla normalmente sólo en el ADN y uracilo se encuentra normalmente sólo en el ARN. Los nucleótidos pueden tener uno, dos o tres grupos fosfato unidos y, en ocasiones, se les denomina nucleósido fosfatos. Los nucleótidos pueden contener nucleósidos modificados que tienen bases modificadas (por ejemplo, 5-metil-citosina) y grupos azúcar modificados (por ejemplo, 2'O-metil ribosilo, 2'O-metoxietil ribosilo, 2'fluoro ribosilo, 2'amino ribosilo, y similares). Un ejemplo de bases no naturales que se usan en la técnica son isocitidina e isoguanina.

Como se usa en este documento, un monómero de marca significa un resto mensurable individual tal como un radioisótopo, fluorocromo, tinción, enzima, nanopartícula, marca quimioluminiscente u otro resto conocido en la técnica, que es mensurable por métodos analíticos. Un monómero de marca puede unirse a un nucleótido usando métodos bien conocidos en la técnica y que se ilustran como ejemplos en este documento.

Los radioisótopos son un ejemplo de monómeros de marca que se pueden utilizar en la invención. Se pueden usar varios radioisótopos como monómeros de marca para marcar nucleótidos, incluidos, por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{125}\text{I}$ . Estos radioisótopos tienen diferentes semividas, tipos de degradación y niveles de energía, que pueden ser adaptados para satisfacer las necesidades de un experimento determinado. Por ejemplo,  $^3\text{H}$  es un emisor de baja energía que tiene como resultado bajos niveles de fondo, aunque esta baja energía da como resultado largos períodos de tiempo para la autorradiografía. Ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos marcados radiactivamente están disponibles en el comercio. Hay disponibles nucleótidos que están marcados radiactivamente en el primer grupo fosfato, o  $\alpha$ , o el tercer grupo fosfato, o  $\gamma$ . Por ejemplo, están disponibles en el comercio tanto  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  como  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ . Adicionalmente, en el comercio hay disponibles también diferentes actividades específicas para nucleótidos marcados radiactivamente, que se pueden adaptar para diferentes experimentos.

Otro ejemplo de monómeros de marca que se pueden utilizar en la invención son los fluoróforos. Se pueden usar varios fluoróforos como monómeros de marca para marcar nucleótidos, incluyendo, por ejemplo, fluoresceína, tetrametil-rodamina y Rojo Tejas. Se conocen varios fluoróforos diferentes, y se fabrican continuamente más, que cubren la totalidad del espectro. Igualmente, se han producido diferentes formulaciones del mismo fluoróforo para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, la fluoresceína se puede utilizar en su forma isotiocianato (FITC), como isómero mixto o

## ES 2 316 603 T3

formas isómeras simples de carboxifluoresceína succinimidil éster (FAM), o como formas diclorotriazina isómeras de fluoresceína (DTAF). Estas marcas son químicamente diferentes, pero todas ellas emiten luz con un pico entre 515-520 nm. Además de las modificaciones químicas de fluoresceína, se han sintetizado fluoróforos completamente diferentes, que tienen picos de emisión iguales o muy similares a los de fluoresceína. Por ejemplo, la tinción Verde Oregón presenta espectros de excitación y emisión prácticamente superponibles frente a la fluoresceína. Otros fluoróforos tales como Verde Rhodol y Verde Rodamina tienen picos de emisión sólo ligeramente desviados y, por lo tanto, actúan como sustitutos de la fluoresceína. Además, se han desarrollado diferentes formulaciones o tinciones relacionadas en torno a otros fluoróforos que emiten luz en otras zonas del espectro.

Hay disponibles fluoróforos amino-reactivos y tiol-reactivos, que se usan para marcar nucleótidos y biomoléculas. Generalmente, los nucleótidos se marcan de forma fluorescente durante la síntesis química, por ejemplo, la incorporación de aminas o tioles durante la síntesis del nucleótido permite la adición de fluoróforos. Los nucleótidos marcados con fluorescencia están disponibles en el comercio. Por ejemplo, existen trifosfatos de uridina y desoxiuridina que se encuentran conjugados con diez fluoróforos diferentes, que cubren todo el espectro.

Las tinciones fluorescentes que se pueden unir directamente a los nucleótidos se pueden usar también como monómeros de marca. Por ejemplo, FAM, JOE, TAMRA y ROX son tinciones fluorescentes amino-reactivas que se han unido a nucleótidos y que se usan en la secuenciación automática de ADN. Estos nucleótidos marcados con fluorescencia, por ejemplo, ROX-ddATP, ROX-ddCTP, ROX-ddGTP y ROX-ddUTP, están disponibles en el comercio.

Existen también monómeros de marca no radiactivos y no fluorescentes. Por ejemplo, se puede unir biotina directamente a los nucleótidos, detectándola por medio de la unión específica y de alta afinidad con avidina o estreptavidina, que se ha acoplado químicamente a una enzima que cataliza la reacción colorimétrica (tal como fosfatasa, luciferasa o peroxidasa). Asimismo, se pueden usar nucleótidos etiquetados con digoxigenina para la detección no isotópica de ácidos nucleicos. En el comercio hay disponibles nucleótidos biotinilados y etiquetados con digoxigenina.

También se pueden usar partículas muy pequeñas, designadas nanopartículas, como monómeros de marca para marcar ácidos nucleicos. Estas partículas tienen un tamaño en el intervalo de 1-1000 nm e incluyen diversas estructuras químicas tales como partículas de oro y plata y puntos cuánticos.

Cuando se irradian con luz blanca que incide de forma angular, las nanopartículas de plata u oro, con un tamaño dentro del intervalo de 40-120 nm diseminan luz monocromática con alta intensidad. La longitud de onda de la luz diseminada depende del tamaño de la partícula. Cuatro a cinco partículas diferentes, situadas en estrecha cercanía, diseminarán luz monocromática que, cuando se superpone, dará lugar a un color específico y único. Compañías tales como Genicon Sciences fabrican partículas de este tipo. Se pueden unir partículas derivatizadas de plata u oro a una extensa gama de moléculas de sonda molecular que incluyen proteínas, anticuerpos, pequeñas moléculas, ligandos de receptores y ácidos nucleicos. Por ejemplo, la superficie de la partícula se puede derivatizar químicamente para permitir el apareamiento con un nucleótido.

Otro tipo de nanopartícula que se puede usar como monómero de marca son los puntos cuánticos. Los puntos cuánticos son cristales fluorescentes de 1 a 5 nm de diámetro, excitables por una amplia gama de longitudes de onda de luz. Estos cristales emiten luz tal como luz monocromática, con una longitud de onda dependiente de su composición química y tamaño. Puntos cuánticos tales como CdSe, ZnSe, InP o InAs poseen propiedades ópticas exclusivas. Estas partículas se han usado en la industria de los semiconductores durante muchos años, pero tan sólo ahora están siendo aplicadas en biología molecular.

Es posible crear muchas docenas de clases de partículas según el número de clases de tamaño de los cristales de punto cuántico. Las clases de tamaño de los cristales se crean 1) por estrecho control de los parámetros de formación del cristal, para generar cada clase de tamaño deseada de partícula, o 2) generando lotes de cristales bajo un control más laxo de los parámetros de formación de los cristales, seguido de una separación según el tamaño y/o las longitudes de onda de emisión deseados. El uso de puntos cuánticos para marcar partículas, en el contexto de la presente invención, es nuevo, pero es antiguo en el campo de los semiconductores. Dos ejemplos de referencias anteriores en las que se incorporan puntos cuánticos en capas epitaxiales intrínsecas de silicio de dispositivos semiconductores emisores de luz/detectores son las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.293.050 y 5.354.707 concedidas a Chapple-Sokol *et al.*

Debido a su muy pequeño tamaño, los puntos cuánticos se pueden acoplar directamente en oligonucleótidos, sin afectar a la solubilidad o uso de los oligonucleótidos. La invención requiere que sólo una molécula de oligonucleótido se acople a cada nanopartícula. Para sintetizar un complejo de oligonucleótido: nanopartícula en una relación 1:1 por química de lote convencional, tanto el oligonucleótido como la nanopartícula requieren un único grupo reactivo de diferentes tipos que se puedan hacer reaccionar entre sí. Por ejemplo, si un oligonucleótido tiene un grupo amino y una nanopartícula tiene un grupo aldehído, estos grupos pueden reaccionar para formar una base de Schiff. Un oligonucleótido se puede derivatizar para incorporar un único grupo amino u otro grupo funcional, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Sin embargo, cuando se derivatiza una nanopartícula, se le recubre con un reactivo químico que da como resultado el revestimiento de toda la superficie de la nanopartícula con varios grupos funcionales.

En este contexto, se proporciona un método para acoplar un oligonucleótido a una nanopartícula por medio del acoplamiento químico del oligonucleótido sobre una superficie sólida tal como el soporte de vidrio usado para la

síntesis del oligonucleótido. Por ejemplo, se pueden utilizar resinas disponibles en el comercio para la síntesis de oligonucleótidos tal como el vidrio de porosidad controlada por un alquilamino de cadena larga (Iaa CPG). De manera alternativa, se puede usar una superficie plana tal como un portaobjetos derivatizado de microscopio. La densidad superficial de las cadenas del oligonucleótido en desarrollo debe ser menor que el diámetro de la nanopartícula. Esto se puede lograr seleccionando un soporte de vidrio con una baja densidad de superficie de los grupos reactivos, o empleando reactivo diluido para la primera etapa de la síntesis del oligonucleótido, de modo que la superficie no esté saturada. Otro punto que se debe considerar cuando se utilicen matrices de vidrio convencionales para la síntesis de oligonucleótidos es usar un diámetro de poro mayor que el diámetro de la nanopartícula, para asegurar el flujo de los reactivos. Por ejemplo, se puede sintetizar un oligonucleótido sobre una base diluida con respecto al soporte sólido, por ejemplo, una décima parte de una síntesis normal, para garantizar un correcto espaciado de los oligonucleótidos sobre el soporte de vidrio. Después de haber sintetizado el oligonucleótido con un grupo reactivo funcional, por ejemplo, un grupo amino, se hacen pasar nanopartículas derivatizadas sobre el soporte de vidrio para que reaccionen con los oligonucleótidos. Se puede seleccionar un tamaño de poro suficientemente grande del soporte de vidrio para prevenir la obturación con las nanopartículas. Por ejemplo, se puede usar un tamaño de poro de aproximadamente 200 nm. Después de finalizar la reacción, los grupos que no han reaccionado en la nanopartícula se pueden bloquear y desacoplar los complejos del soporte de vidrio.

Las marcas de la invención están unidas a los ácidos nucleicos por medio de nucleótidos en el ácido nucleico. Es posible unir, en primer lugar, un nucleótido a un monómero de marca y, a continuación, se puede incorporar el monómero de marca:nucleótido a un ácido nucleico, o se puede marcar un ácido nucleico existente uniendo un monómero de marca a un nucleótido en el interior del ácido nucleico.

La unión de un monómero de marca a un nucleótido se puede llevar a cabo usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, y que se describen en este documento. Por ejemplo, el monómero de marca se puede unir directamente al nucleótido en una correspondencia 1:1 mediante la incorporación de un fosfato radiactivo en el esqueleto fosfato del nucleótido. Asimismo, se ha comunicado, por ejemplo, un método general para marcar fosfatos con una marca fluorescente que emplea un derivado de imidazol preparado a partir de una hidrazida BODIPY FL (Wang y Giese, *Anal. Chem.* 65: 3518 (1993)).

En función del resto de marca usado, puede ser deseable derivatizar o modificar químicamente un nucleótido para unir el monómero de marca. Estos métodos y procedimientos químicos son conocidos en la técnica. Adicionalmente, se puede usar un enlazador para unir un monómero de marca a un nucleótido en una correspondencia 1:1. Por ejemplo, un nucleótido marcado con fluorescencia tal como una fluoresceína-12-dUTP puede tener un monómero de fluoróforo unido por medio de un grupo aminoalquilo de cuatro átomos a la molécula de dUTP.

Estos nucleótidos unidos a monómeros de marca se pueden incorporar en un ácido nucleico utilizando diversos métodos para el marcado de ácidos nucleicos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar enzimas tales como ADN o ARN polimerasas, Taq polimerasas, desoxinucleotidil-transferasas terminales o transcriptasas inversas para la incorporación de nucleótidos marcados en ácidos nucleicos.

Los nucleótidos marcados pueden ser incorporados en ácidos nucleicos, por ejemplo, por medio del método denominado "*nick translation*". En este procedimiento, se usa DNAsa I para crear "*nicks*" de cadena sencilla en ADN de doble cadena y, a continuación, se usan las acciones de la exonucleasa 5' a 3' y de la polimerasa 5' a 3' de la ADN polimerasa I de *E. coli* para separar los tramos de ADN de cadena sencilla, comenzando en los *nicks*, sustituyéndolos por nuevas cadenas preparadas por la incorporación de nucleótidos marcados. El procedimiento de *nick translation* puede utilizar cualquier nucleótido marcado, incluidos los nucleótidos marcados radiactivamente y los nucleótidos biotinilados y etiquetados con digoxigenina. De manera similar, se puede usar la ADN polimerasa T4 para incorporar nucleótidos marcados. Adicionalmente, los nucleótidos marcados se pueden incorporar en ácidos nucleicos usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Taq polimerasas. El grado de marcado se puede controlar mediante la inclusión de uno, o hasta los cuatro nucleótidos marcados. Además, el grado de marcado se puede controlar aumentando o reduciendo la concentración de nucleótido(s) marcado(s).

Otros métodos adicionales para marcar ácidos nucleicos incluyen la generación de ADNc de cadena sencilla a partir de ARN, usando una transcriptasa inversa en presencia de nucleótidos marcados. Además, se puede clonar el ADN en un vector con sitios de la polimerasa SP6 o T7. La transcripción en presencia de ARN polimerasa SP6 o T7 y nucleótidos marcados da como resultado un transcripto de ARN marcado. El transcripto se puede marcar en diferentes grados mediante la inclusión de uno o múltiples nucleótidos marcados. Además, es posible marcar varios nucleótidos dentro de un ácido nucleico, por ejemplo, clonando ADN en un vector basado en el bacteriófago M13. Entonces, se pueden usar el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y el cebador de la sonda universal M13 para sintetizar la cadena complementaria, con incorporación de nucleótidos marcados.

Se han descrito anteriormente varios métodos para incorporar nucleótidos marcados en ácidos nucleicos recién sintetizados. Los ácidos nucleicos existentes también se pueden marcar usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede proceder al marcado terminal de ARN o ADN con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y T4 polinucleótido quinasa. Esta quinasa se puede usar para transferir el fosfato radiactivo de ATP a un grupo 5' OH libre en el ADN o el ARN. La enzima muestra, además, una actividad fosfatasa, por lo que pueden producirse dos reacciones. En la reacción hacia delante, la enzima cataliza la fosforilación tras la separación de los fosfatos 5' terminales con fosfatasa alcalina (u otra fosfatasa). En la reacción de intercambio, la quinasa cataliza el intercambio de un 5' fosfato existente

## ES 2 316 603 T3

por un tercer o fosfato- $\gamma$  de ATP. Esta última reacción se lleva a cabo en presencia de un exceso de ATP y ADP para una fosforilación eficaz. Con el uso de este método, se transfiere el fosfato radiactivo de ATP al extremo de la molécula de ácido nucleico.

5 Los ácidos nucleicos se pueden marcar también con desoxinucleotidil-transferasa terminal que añade nucleótidos marcados al extremo 3' de fragmentos de ADN. Como sustratos para esta enzima sirven los ADN tanto de cadena sencilla como doble. El fragmento grande (Klenow) de la ADN polimerasa I de *E. coli* se puede usar también para marcar los extremos de ácidos nucleicos. Dado que esta enzima tiene una actividad de polimerasa 5' a 3', se la puede utilizar para "rellenar" los extremos 3' de fragmentos de ADN opuestos a las extensiones 5' o proyecciones con  
10 nucleótidos marcados. El marcado terminal de ácidos nucleicos usando polinucleótido quinasa o desoxinucleotidil-transferasa da como resultado la incorporación de una marca por ácido nucleico. La reacción de "relleno" se puede usar para marcar el ácido nucleico en un nucleótido por ácido nucleico o en más de un nucleótido por ácido nucleico.

Adicionalmente, los ácidos nucleicos se pueden marcar por medio de la modificación de nucleótidos en el interior del ácido nucleico. Por ejemplo, los residuos citidina en el ADN y ARN se pueden modificar por reacción con bisulfito  
15 sódico para formar intermedios sulfonato que, entonces, se pueden acoplar directamente con hidrazidas o aminas alifáticas. En esta reacción, se puede utilizar prácticamente cualquiera de las hidrazidas o aminas alifáticas fluorescentes, de biotina o de otro tipo. El ácido citidílico activado por bisulfito se puede acoplar también con diaminas alifáticas tales como etilendiamina. El ADN o ARN modificado por aminas se puede modificar, entonces, con cualquiera de las tinciones reactivas con aminas. Además, los grupos fosfatasa se pueden dianizar en ácidos nucleicos para el marcado. Aun cuando los grupos fosfato de los nucleótidos no son demasiado reactivos en solución acuosa, sus grupos  
20 fosfato terminales pueden reaccionar con carbodiimidas y reactivos similares en combinación con nucleófilos para dar fosfodiésteres, fosforamidatos y fosforotioatos marcados. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar cuantitativamente el ADN con carbonildiidimidazol y una diamina tal como etilendiamina para dar un fosforoamidato que tiene una amina  
25 primaria libre, la cual puede ser modificada luego con reactivos que reaccionan con aminas. Se han acoplado aminas fluorescentes o biotiniladas con el 5' fosfato de ARNt usando ditiodipiridina y trifenílfosfina.

La unión entre marcas y ácidos nucleicos pueden ser enlaces covalentes o enlaces no covalentes que son estables a las condiciones de hibridación y lavado. Las marcas pueden estar unidas con un ácido nucleico de una manera  
30 específica para la secuencia, por ejemplo, mediante la incorporación de un nucleótido marcado en ADN que ha sido digerido con una enzima de restricción. De manera alternativa, las marcas pueden estar unidas a un ácido nucleico de forma no específica para la secuencia, por ejemplo, por la incorporación de una marca en el fosfato terminal de un ácido nucleico usando [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP y T4 polinucleótido quinasa.

35 Se pueden usar varios tipos de ácidos nucleicos con esta invención, incluidos una molécula de ADN de cadena sencilla o doble o de ARN, que puede incluir, por ejemplo, ADN genómico, ADNc y ARNm. Se pueden utilizar moléculas de ácido nucleico de origen tanto sintético como natural. En relación con la presente invención, la molécula de ácido nucleico puede tener configuración lineal, circular o ramificada, y puede representar una cadena con sentido o antisentido, o ambas, de una molécula nativa de ácido nucleico. Es posible incorporar bases nucleotídicas no halladas  
40 en la naturaleza tales como isocitidina e isoguanina en el ácido nucleico.

Las marcas se pueden unir a los ácidos nucleicos en una serie de formas distintas. Por ejemplo, un monómero de marca particular puede unirse con un ácido nucleico en solamente una posición en el ácido nucleico o en muchas  
45 posiciones en el mismo. Además, un monómero de marca particular puede unirse a un ácido nucleico, y uno o múltiples monómeros de marca pueden unirse también al mismo ácido nucleico. En este caso, la marca puede contener una mezcla de dos o múltiples marcas. Adicionalmente, los ácidos nucleicos marcados con cualquiera o todas estas combinaciones pueden unirse a otro ácido nucleico por hibridación.

Se introduce diversidad adicional cuando el ácido nucleico está ramificado. Un ejemplo de ácido nucleico rami-  
50 ficado es un dendrímero. Los dendrímeros están compuestos por capas de ácido nucleico, en donde cada capa está compuesta por heterohíbridos parcialmente monocatenarios que proporcionan una estructura tridimensional compuesta por ácidos nucleicos. Diversas configuraciones de moléculas de ácido nucleico pueden dar lugar a un elevado número de estructuras dendríticas de diferentes formas, incluido, por ejemplo, un dendrímero con un tallo y 81 ramas, o dendrímeros con estructuras en forma de tridente, peine o burbuja. La capa más externa de un dendrímero determinado  
55 puede tener múltiples brazos monocatenarios capaces de hibridar con una secuencia complementaria de ácidos nucleicos. Debido al tamaño relativamente grande de las moléculas de ácido nucleico, los dendrímeros de ácidos nucleicos pueden contener numerosas marcas con un impedimento estérico limitado. El uso de dendrímeros puede multiplicar la señal generada por un ácido nucleico marcado por un factor predeterminado igual al número de ramas.

60 Por medio del uso de ácidos nucleicos ramificados es posible formar varias combinaciones exclusivas de marcas. Por ejemplo, utilizando diferentes grupos protectores químicos, un monómero de marca puede unirse a una rama, en tanto que una o múltiples monómeros de marca adicionales se unen a otras ramas. Adicionalmente, los ácidos nucleicos marcados pueden enlazarse en distintas combinaciones con las ramas de un dendrímero mediante hibridación.

65 La invención ofrece una población diversa de 30, o aproximadamente 40, 60, 80, 100, 120, 140 ó 150 marcas exclusivas unidas a un ácido nucleico. Parte de esta población puede estar compuesta por diferentes monómeros de marca individuales. La invención proporciona, igualmente, marcas exclusivas formadas por una combinación de dos o múltiples marcas diferentes. Esto puede incrementar sustancialmente el número de marcas exclusivas.

## ES 2 316 603 T3

Una marca exclusiva es una marca que genera una señal que es distinguible de otras marcas en la misma mezcla. Por lo tanto, la designación como marca exclusiva depende de la sensibilidad del equipo de detección utilizado. Por ejemplo, cuando se usan marcas fluorescentes o de nanopartículas, se puede utilizar una cámara CCD para detectar las marcas. La sensibilidad de este equipo depende del fabricante, modelo y diseño del equipo. Además, el usuario puede establecer varios parámetros para lograr la máxima sensibilidad. Por ejemplo, el uso de diferentes conjuntos de filtros puede aumentar la sensibilidad de detección en ciertos experimentos.

La capacidad para distinguir entre marcas diferentes depende también de las propiedades particulares de la marca. Por ejemplo, algunos fluoróforos emiten luz dentro de un pico o intervalo extenso de longitudes de onda, en tanto que otros fluoróforos emiten luz dentro de un pico estrecho. Los fluoróforos que emiten luz dentro de un pico ancho pueden oscurecer los picos vecinos. Además, las formas de los picos de emisión de diferentes fluoróforos varían. Por ejemplo, algunos fluoróforos tienen un pico que posee una elevación aguda, pero un extremo final ancho que puede oscurecer los picos vecinos. Si no es posible distinguir dos picos, entonces las dos marcas asociadas con estos picos no pueden ser consideradas exclusivas. Cuando se usan marcas fluorescentes, las marcas emitirían luz fluorescente a longitudes de onda distintas, esencialmente no superpuestas, que exhiben una distancia entre ellas de al menos 1 nm, 5 nm, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm y, preferentemente, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm y, más preferentemente, de al menos 50 nm. Por ejemplo, el pico de emisión de la tinción n° 1 podría ser de 585 nm, y el pico de emisión de la tinción n° 2 podría ser de 630 nm.

Una marca exclusiva es una marca que genera una señal que es distinguible de otras marcas en la misma mezcla. Por consiguiente, una marca exclusiva depende de las otras marcas incluidas en la mezcla. Por ejemplo, la fluoresceína, que tiene un pico de espectros de emisión de 518 nm, y el rojo rodamina, con un pico de espectros de emisión de 590 nm, muestran picos de emisión claramente distintos y, por lo tanto, se les considera marcas exclusivas cuando están incluidas juntas en una mezcla. Sin embargo, si se agrega otro fluoróforo con un pico de emisión que se superponga al de fluoresceína o rojo rodamina, estas marcas dejan de ser exclusivas. Por ejemplo, si se añade verde Oregón (pico de espectros de emisión 522 nm) a la mezcla anterior, el pico de emisión de fluoresceína y de verde Oregón pueden solaparse tanto que, en función del equipo de detección utilizado, no puedan distinguirse claramente entre sí y, por tanto, ni la fluoresceína ni el verde Oregón pueden actuar como marcas exclusivas en esa mezcla particular.

Con frecuencia, se sintetizan varias formulaciones de la misma marca o marcas relacionadas para ser usadas en diferentes aplicaciones y, aunque estas marcas tienen diferentes propiedades químicas, no son distintas en términos de detección. Por ejemplo, la fluoresceína se puede usar en su forma isotiocianato (FITC), como isómero mixto o formas isómeras únicas de carboxifluoresceína succinimidil éster (FAM), o formas de diclorotriazina isómera de fluoresceína (DTAF). Estas marcas son químicamente distintas, pero todas ellas emiten luz con un pico entre 515-520 nm y, por consiguiente, se superpondrían hasta aparecer como idénticas en la mayor parte de los equipos de detección disponibles actualmente. Además de las modificaciones químicas de la fluoresceína, se han sintetizado fluoróforos completamente diferentes, que tienen picos de emisión iguales o muy similares a los de fluoresceína. Por ejemplo, la tinción Verde Oregón muestra espectros de excitación y emisión prácticamente superponibles en comparación con la fluoresceína. Otros fluoróforos tales como Verde Rhodol y Verde Rodamina sólo exhiben picos de emisión ligeramente desviados y, por tanto, sirven funcionalmente también como sustitutos de la fluoresceína.

Se conoce un número limitado de diferentes monómeros de marca que se pueden usar conjuntamente en una mezcla, proporcionando señales exclusivas. Por ejemplo, se pueden marcar de manera distinta cinco analitos usando el conjunto de fluoróforos BODIPY de Molecular Probes (Eugene, OR). Estos fluoróforos tienen los siguientes picos de emisión distintos: BODIPY FL(513); BODIPY R&G (550), BODIPY TMR (574), BODIPY 581/591 (592), y BODIPY TR (617). Al objeto de obtener resultados claros usando los equipos de detección actualmente disponibles, el número de fluoróforos diferentes que se pueden usar es menor que treinta.

También se pueden generar marcas exclusivas combinando dos o múltiples monómeros de marca diferentes para crear una marca nueva. La señal de la marca resultante debe ser distinguible de las señales de otras marcas empleadas en el mismo experimento para que sea una marca exclusiva. Por ejemplo, un ácido nucleico marcado con fluoresceína y rodamina emitirá luz a una longitud de onda diferente de la de un ácido nucleico marcado con fluoresceína o rodamina por separado.

En esta invención, es posible combinar diversas relaciones de diferentes monómeros de marca unidos a ácidos nucleicos para generar una población diversa de marcas exclusivas, que puede incluir hasta  $10^{17}$  o más marcas exclusivas. Por ejemplo, un ácido nucleico marcado con dos nucleótidos marcados con fluoresceína y tres nucleótidos marcados con rodamina emitirá luz en una longitud de onda diferente si se le compara con un ácido nucleico marcado con tres nucleótidos de fluoresceína y dos nucleótidos de rodamina. En otro ejemplo, se podría marcar un ácido nucleico con relaciones diferentes de tres o más monómeros de marca: nucleótidos, lo que aumenta en gran medida la variedad de marcas exclusivas que pueden ser generadas.

La señal generada por cada uno de los monómeros de marca unidos a los nucleótidos se puede homologar para que alcance aproximadamente la misma señal unitaria. Por ejemplo, si se sabe que el monómero fluorescente A emite cuantos de luz diferentes a los del monómero fluorescente B, la señal de las marcas exclusivas que contienen un número predeterminado de estos monómeros se puede homologar en base a las propiedades conocidas de señal de los monómeros de marca y al número de cada monómero presente en la marca exclusiva. En la invención se pueden utilizar números diferentes de marcas y, por lo tanto, se pueden usar diferentes múltiplos de la misma señal unitaria en esta

invención. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede marcar con dos fluoróforos y otro ácido nucleico se puede marcar con seis fluoróforos. El segundo ácido nucleico tendrá un número tres veces mayor de señales que el primero. Dado que se conoce el número de monómeros de marca unidos a cada ácido nucleico, las señales de los ácidos nucleicos marcados se pueden homologar en base al número de monómeros de marca presentes. Por ejemplo, la señal del ácido nucleico con seis fluoróforos se puede dividir por tres, lo que homologa la señal en relación con la señal del ácido nucleico con dos fluoróforos.

Este método para producir marcas da como resultado ventajas importantes con respecto a las técnicas existentes tales como los formatos de micromatrices. Puesto que cada analito está identificado de manera exclusiva por una marca con aproximadamente la misma señal unitaria, permite efectuar un recuento directo de las marcas, dando lugar a una lectura digital de cada especie molecular en una mezcla. Por el contrario, los datos de micromatrices deben ser sometidos a varias transformaciones intermedias para cuantificar el número de moléculas, lo que resulta en un rendimiento analógico menos preciso. Además, el uso de una diversidad de marcas con la misma señal unitaria permite que el método de detección opere dentro de un intervalo dinámico estrecho, lo que conlleva una mejor sensibilidad del sistema, dado que se evita establecer un compromiso entre sensibilidad e intervalo dinámico.

La invención ofrece una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva. Esta población de sondas contiene aproximadamente 30 o más sondas específicas de ácido nucleico unidas a una marca exclusiva, fijada a un ácido nucleico. Adicionalmente, la invención proporciona una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva que contienen una diversidad de 50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000,  $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$  y, aproximadamente  $1 \times 10^5$  o más marcas diferentes. Tal como se ha descrito anteriormente, estas marcas exclusivas pueden contener una mezcla de dos o más marcas diferentes, y comprende aproximadamente la misma señal unitaria o múltiplos de la misma.

La invención propone una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva, en la que un ácido nucleico específico para la diana contiene un ácido nucleico unido a una marca exclusiva. Además, la invención ofrece una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva que contiene dos poblaciones unidas de ácidos nucleicos, una población de ácidos nucleicos que contiene treinta o más sondas de ácidos nucleicos específicas para la diana, y una segunda población de ácidos nucleicos que contiene un ácido nucleico unido por una marca exclusiva.

Una sonda específica para una diana significa un agente que se fija selectivamente a un analito diana. Este agente se unirá con afinidad preferencial a la diana, mostrando a la vez escasa o nula reactividad cruzada detectable frente a otras moléculas.

El analito diana es un ácido nucleico. Por ejemplo, una diana puede ser un ácido nucleico que es reconocido y fijado específicamente por un ácido nucleico complementario, que incluye, por ejemplo, un oligonucleótido o un producto de PCR, o un ácido nucleico no natural tal como un ácido nucleico de alta afinidad (o "cerrado" = *locked nucleic acid*, LNA) o un ácido nucleico peptídico (PNA).

Los aptámeros son secuencias de ácidos nucleicos que tienen estructuras tridimensionales capaces de fijar dianas moleculares pequeñas, incluidos iones metálicos, tinciones orgánicas, medicamentos, aminoácidos, co-factores, aminoglucósidos, antibióticos, análogos de bases de nucleótidos, nucleótidos y péptidos (Jayasena, S.D. *Clinical Chemistry* 45:9, 1628-1650, (1999)), incorporado a este documento como referencia. Los ácidos nucleicos pueden estar unidos directamente con el aptámero o estar unido mediante el uso de hibridación.

La población de marcas de la invención se produce por un método consistente en la síntesis de una población de ácidos nucleicos unidos a una relación predeterminada de al menos dos marcas diferentes. El método implica la incorporación de nucleótidos marcados a una estructura de ácidos nucleicos repetidos, usando ADN polimerasa. Las estructuras de ácidos nucleicos repetidos se pueden diseñar para permitir la incorporación de una relación predeterminada de marcas. Por el uso de este método es posible generar varias marcas exclusivas a partir de un número reducido de marcas iniciales.

En el Ejemplo 1 se ofrece un ejemplo específico de este método, en el que se preparan diez marcas exclusivas a partir de dos marcas diferentes. En pocas palabras, se sintetizan diez moldes únicos de un ADN monocatenario de 220 pares de bases. Los moldes consisten en una relación predeterminada de las siguientes repeticiones de 20 pares de bases, en donde  $n+m = 11$ : 5' (ACTCTCTCTCTCTCTCTC)<sub>n</sub> (GCTCTCTCTCTCTCTCTC)<sub>m</sub> 3' (SEQ ID NO: 1). La segunda cadena se sintetiza usando el cebador GAGAGAGAGA (SEQ ID NO: 2), polimerasa de Klenow, ADN ligasa, dGTP, dATP y dCTP y dUTP, cada una marcada con un fluoróforo diferente. Los nucleótidos marcados se incorporarán en el ADN en una relación exclusiva, determinada por la relación de las dos repeticiones. En este ejemplo, el resultado final es de diez ácidos nucleicos marcados de forma exclusiva, en donde la relación establecida de los dos fluoróforos es 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2 y 10:1.

En el Ejemplo 1, dos marcas diferentes han dado como resultado diez marcas exclusivas. Usando el mismo protocolo, tres marcas diferentes resultarían en 30 marcas exclusivas, cuatro marcas diferentes lo harían en 60 marcas exclusivas, cinco marcas diferentes darían como resultado 100 marcas exclusivas, etc. Para el experto en la técnica serán evidentes diversas variaciones del método. Por ejemplo, se puede cambiar el número de repeticiones para hacerlo menor o mayor que diez. Un número incrementado de repeticiones aumentará el número de relaciones únicas posibles. Esto dará como resultado un incremento del número de marcas exclusivas que pueden ser generadas a partir

## ES 2 316 603 T3

del mismo número de marcas diferentes iniciales. También en el Ejemplo 1, la relación entre los dos fluoróforos puede incluir 0:11 y 11:0, lo que da como resultado dos marcas adicionales que contienen uno u otro fluoróforo.

El experto en la técnica reconocerá que la secuencia de los moldes puede diferir de la que se muestra más arriba. Por ejemplo, la secuencia repetida en el molde puede ser  $(GA)_n$  en lugar de  $(CT)_n$ . Además, la secuencia repetida podría ser un único homopolímero nucleotídico tal como  $(A)_n$ . Con un molde homopolímero, se pueden incorporar tres nucleótidos marcados en diferentes relaciones, aumentando de este modo el número de marcas exclusivas que se pueden generar. Usando el método reivindicado, es posible generar un elevado número de marcas exclusivas, que incluye 40, 60, 80, 100, 120, 140, 150, 200, 500, 2.000, 5.000,  $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  o más marcas. Una vez más, tal como se ha descrito anteriormente, estas marcas exclusivas pueden comprender aproximadamente la misma señal unitaria o múltiplos de ésta.

Otras posibles modificaciones del método consisten en cambiar la longitud de la repetición, por ejemplo, a menos o a más de 20 pares de bases. La repetición sirve para separar los nucleótidos marcados y, por lo tanto, la reducir las posibles interferencias entre las marcas. En el caso de una marca fluorescente, esto puede reducir la extinción entre fluoróforos. Además, se puede modificar el protocolo para incorporar los nucleótidos marcados en el ADN, tal como resulta evidente para un experto en la técnica y se describe en este documento.

En una realización, el ADN marcado descrito anteriormente se puede unir con un dendrímero. Se pueden sintetizar marcas oligonucleotídicas en las ramas del dendrímero, para permitir la unión del ADN marcado. Por ejemplo, se puede unir un enlazador al ADN marcado anteriormente descrito, que corresponde a una etiqueta oligonucleotídica en las ramas del dendrímero. El experto en la técnica conoce varios tipos de enlazadores. Por ejemplo, se puede unir un enlazador de enzima de restricción al ADN marcado. Estos enlazadores son oligonucleótidos de doble cadena que contienen la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción determinada. Estos enlazadores pueden ligarse sobre ADN de doble cadena usando una ADN ligasa y ser digeridos usando la enzima de restricción apropiada. El resultado es una secuencia monocatenaria que se proyecta y que se encuentra disponible para hibridar con otro ácido nucleico.

El ADN marcado descrito anteriormente se puede unir directamente con una sonda específica para la diana. Adicionalmente, el ADN marcado se puede unir indirectamente con una sonda específica para la diana, por ejemplo, mediante el uso de un ácido nucleico que actúa de puente. Una o múltiples de estas marcas pueden unirse a cada sonda específica para la diana. La unión de una sonda específica para la diana marcada de forma exclusiva con un analito diana da como resultado el marcado exclusivo de ese analito. Este marcado permite identificar el analito diana en una mezcla de analitos.

Adicionalmente, se puede incrementar el número de marcas exclusivas combinando las marcas exclusivas descritas anteriormente en diferentes combinaciones. En relación con la invención, se puede unir una marca a una sonda de ácido nucleico a través de un método que comprende hibridar una sonda de ácido nucleico que tiene un *genedigit* a un anti-*genedigit* que presenta una marca. Los anti-*genedigits* que contienen las marcas descritas anteriormente se hibridan con *genedigits*. Los *genedigits* pueden unirse entre sí en combinaciones únicas, creando un número todavía mayor de marcas exclusivas. El diseño modular de los *genedigits* permite aportar flexibilidad al número de marcas exclusivas generadas. Por ejemplo, si se utiliza un número alto de módulos de *genedigit*, se dispondrá de un número también elevado de moldes únicos para la unión a marcas exclusivas. El número de moldes generados se puede ajustar para cubrir el número de especies en la mezcla.

Un *genedigit* puede ser una región de una secuencia nucleotídica o aminoácida predeterminada, que actúa como punto de unión para una marca. El *genedigit* puede tener cualquier secuencia, incluida, por ejemplo, una única secuencia exclusiva o una secuencia que contiene elementos centrales repetidos. Sin embargo, cada *genedigit* tiene una secuencia única que lo diferencia de otros *genedigits*. Cuando se agrega a una mezcla compleja de dianas, un *genedigit* de ácido nucleico puede contener bases no naturales tales como isocitidina e isoguanina, que pueden reducir la hibridación con secuencias diana de origen natural. La secuencia, la longitud de un elemento central, y el número de elementos centrales repetidos pueden variar de acuerdo con requisitos particulares de un experimento, y resultará evidente para el experto en la técnica. Por ejemplo, un elemento central de ácido nucleico puede tener entre 5 y 12 pares de bases de longitud, y el elemento central puede estar repetido desde una hasta aproximadamente diez veces.

Es posible sintetizar diferentes *genedigits* que tienen una unidad central que difiere de las unidades centrales de otros *genedigits*, por ejemplo, en al menos dos bases. Mediante la combinación de estos *genedigits* exclusivos en diversas combinaciones, se puede sintetizar un alto número de estructuras diversas. Por ejemplo, se pueden sintetizar 50 *genedigits* con secuencias exclusivas, separándolos en cinco grupos que contienen diez *genedigits* en cada grupo. Los *genedigits* de cada grupo se pueden sintetizar para que tengan una marca corta en cada extremo. A continuación, se une un *genedigit* de cada grupo usando un oligonucleótido adaptador que es complementario a las marcas que son comunes para cada grupo. En este ejemplo, son posibles  $1 \times 10^5$  ( $10 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10$ ) combinaciones únicas.

Los *genedigits* sirven como puntos de acoplamiento para las marcas exclusivas descritas anteriormente. Dado que los *genedigits* pueden unirse entre sí en combinaciones únicas, esto aumenta en gran medida el número de marcas exclusivas. Mediante el enlace de *genedigits* entre sí es posible generar un gran número de marcas exclusivas, incluidas 200, 500, 2.000, 5.000,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  o más marcas exclusivas.

## ES 2 316 603 T3

En relación con la invención, se puede unir una marca a una sonda de ácido nucleico mediante un método que comprende hibridar una sonda de ácido nucleico que tiene un *genedigit* a un anti-*genedigit* que posee una marca en la que el *genedigit* comprende un conjunto de tres o más secuencias repetidas, y el anti-*genedigit* comprende un conjunto cognado de al menos dos secuencias repetidas complementarias, en donde el anti-*genedigit* hibrida específicamente con el *genedigit* a través de una secuencia que tiene una complejidad menor que el número de pares de bases hibridadas.

En el Ejemplo 2 se ofrece un ejemplo de *genedigit* de ácido nucleico. Brevemente, en este ejemplo se repite cinco veces un elemento central de ocho pares de bases que contiene las bases no naturales isocitidina e isoguanina. El resultado es un *genedigit* de 40 pares de bases. En este ejemplo, el anti-*genedigit* consiste en una secuencia que es complementaria para tres de los cinco elementos centrales en el *genedigit*. Un anti-*genedigit* puede contener el mismo número, o un número menor de secuencias repetidas comparado con el *genedigit*, con la condición de que el anti-*genedigit* sea capaz de unirse específicamente con el *genedigit*. En este ejemplo, el anti-*genedigit* es una secuencia de 24 pares de bases que puede unirse al *genedigit* de 40 pares de bases en tres registros diferentes (véase la Figura 1C).

El anti-*genedigit* en este ejemplo específico es una secuencia de 24 pares de bases que sólo tiene la complejidad de una secuencia de ocho pares de bases. Complejidad se refiere al grado de elementos repetidos entre dos ácidos nucleicos que están hibridando en una solución. Cuando las moléculas de ácido nucleico que deben hibridar contienen elementos centrales repetidos o regiones homopolímeras, existen muchas oportunidades de apareamiento, de forma que la hibridación se produce rápidamente. Cuando las moléculas de ácido nucleico que deben hibridar no contienen ningún elemento central repetido, existe entonces una sola forma de hibridar dos secuencias, por lo que el procedimiento sucede más lentamente. Se afirma que las secuencias que hibridan rápidamente tienen una baja complejidad, en tanto que las secuencias que tardan más en hibridar tienen una complejidad mayor. En este ejemplo, una secuencia de *genedigit* de 40 pares de bases, compuesta por cinco repeticiones directas de un elemento central de 8 pares de bases, puede hibridar con un anti-*genedigit* de 24 pares de bases que contiene tres repeticiones del elemento central de 8 pares de bases en tres registros diferentes. De esta forma, el anti-*genedigit* puede hibridar con el *genedigit* de 40 pares de bases a través de una secuencia de 24 pares de bases que sólo tiene una complejidad de una secuencia de 8 pares de bases. La ventaja de este método es que la hibridación tendrá lugar de manera más rápida y eficaz.

En el ejemplo específico anterior, se ha descrito un elemento central de 8m pares de bases; sin embargo, un elemento central puede tener más o menos de 8 pares de bases. Por ejemplo, un elemento central puede tener entre 5 y 12 pares de bases. En consecuencia, una variación de las repeticiones en el elemento central cambiará la complejidad. Por ejemplo, si un elemento central tiene entre 5 y 12 pares de bases, la complejidad estará entre 5 y 12. Además, un anti-*genedigit* puede unirse a un *genedigit* usando la totalidad o parte de su secuencia. En el ejemplo anterior, un anti-*genedigit* de 24 pares de bases puede unirse al *genedigit* con menos de 24 bases, por ejemplo, 15 a 23 pares de bases.

El anti-*genedigit* sirve como conector entre el *genedigit* y la marca. El anti-*genedigit* se fija al *genedigit*, y el anti-*genedigit* se une a una marca directa o indirectamente al estar unido a un dendrímero que tiene una o varias marcas fijadas. El anti-*genedigit* contiene también una secuencia enlazadora que permite la unión a un dendrímero. Por ejemplo, se puede sintetizar una etiqueta oligonucleotídica en el tallo de un dendrímero que es complementario a la secuencia enlazadora en el anti-*genedigit*. Tal como se ha descrito anteriormente, se pueden usar varios tipos de enlazadores. De esta forma, las secuencias repetidas del anti-*genedigit* son libres para hibridar con su correspondiente *genedigit*, dando como resultado la unión específica de una marca a un *genedigit*.

Los *genedigits* y los anti-*genedigits* pueden estar compuestos por ácidos nucleicos, incluidos aptámeros.

En relación con la invención, se puede unir una sonda específica para la diana a uno o múltiples *genedigits* para formar un “especificador”. Los *genedigits* pueden estar unidos directamente o pueden estar unidos a la región específica para la diana, usando una secuencia de intervención o adaptación. Tal como se ha descrito anteriormente, el área específica para la diana puede ser un ácido nucleico, incluido un aptámero. El área específica para la diana está diseñada para unirse específicamente a un analito en una mezcla. De esta forma, es posible marcar un analito con una marca exclusiva.

Un especificador puede contener uno o múltiples *genedigits*. Por ejemplo, un especificador puede contener cuatro, cinco o más *genedigits*. El número de *genedigits* en un especificador determinará el número de marcas exclusivas que están disponibles para unirse a los analitos en una mezcla. Por lo tanto, para marcar cada analito en una mezcla compleja, se puede sintetizar una población extensa de especificadores que contengan diversas combinaciones de *genedigits*. De manera alternativa, para marcar uno o un número reducido de analitos en una mezcla, se puede sintetizar uno o múltiples especificadores que contengan uno o pocos *genedigits*. Adicionalmente, un especificador puede contener una marca común tal como una etiqueta de biotina. Estas marcas pueden facilitar la síntesis y purificación de especificadores.

Tal como se ha señalado en este documento, la invención se refiere a una población de sondas de ácido nucleico marcadas de forma exclusiva. El método para proporcionar dicha población consiste en sintetizar una población de sondas de ácido nucleico marcadas de forma exclusiva, en donde cada una de ellas tiene un especificador diferente; a continuación, se sintetiza una población correspondiente de anti-*genedigits* en donde cada uno de ellos tiene una marca exclusiva y, finalmente, hibridar las poblaciones de sondas de ácido nucleico diana con los anti-*genedigits* para producir una población en la que cada una de las sondas específicas para la diana está marcada de forma exclusiva.

## ES 2 316 603 T3

La invención proporciona, adicionalmente, un método para detectar un analito de ácido nucleico, haciendo contactar una mezcla de analitos de ácido nucleico con una población de sondas específicas para la diana, cada una fijada a una marca exclusiva, bajo condiciones suficientes para la hibridación de las sondas a la diana, y medir la señal resultante de una o múltiples sondas específicas para la diana hibridadas con un analito, en donde la señal identifica de manera exclusiva el analito.

El analito de ácido nucleico puede contener cualquier tipo de ácido nucleico, incluida, por ejemplo, una población de ARN o una población de copias de ADNc. La invención ofrece al menos una sonda específica para la diana para cada analito en una mezcla. La invención proporciona, igualmente, una sonda específica para la diana que contiene un ácido nucleico unido a una marca exclusiva. Adicionalmente, la invención proporciona dos poblaciones unidas de ácidos nucleicos, una población de ácidos nucleicos que contienen una pluralidad de sondas de ácido nucleico específicas para la diana, y una segunda población de ácidos nucleicos que contiene un ácido nucleico unido a una marca exclusiva. Cuando las sondas específicas para la diana se fijan a marcas exclusivas, esto permite la identificación exclusiva de los analitos diana.

Los métodos de la invención son ventajosos porque la hibridación se puede llevar a cabo en solución en un volumen reducido (0,01-2,0  $\mu$ l), lo que asegura una alta concentración de los ácidos nucleicos que controlarán la velocidad de hibridación. Los métodos de la invención utilizan dos tipos diferentes de hibridación. La primera hibridación es entre una mezcla compleja de analitos y los especificadores, y el segundo tipo de hibridación tiene lugar entre los especificadores y las marcas.

En el primer tipo de hibridación entre una mezcla compleja de analitos y una población de especificadores, estos últimos están en exceso. Por ejemplo, los especificadores pueden estar presentes en un exceso de 10 a 100 veces con respecto a los analitos en la mezcla compleja. La cinética de esta reacción se puede describir por la ecuación siguiente:

$$t_{1/2} = \frac{N \ln 2}{3,5 \times 10^5 \times L^{0,5} \times C_0}$$

en donde N es la complejidad de la sonda (los especificadores), L es la longitud,  $C_0$  es la concentración de la sonda, y  $t_{1/2}$  es el tiempo necesario para que se complete 50% de la reacción. Usando esta ecuación, es evidente que concentraciones mayores de la sonda darán como resultado un tiempo más breve necesario para que se complete la reacción en 50%. La muestra, en esta hibridación, puede ser ARN o ADN. Si la muestra no es ARN poli A, es necesario marcarla previamente por algún método, por ejemplo, platino-digoxigenina. Después de completar la hibridación, los híbridos (dúplex) que contienen el analito y el especificador se separan usando la poli A, o la etiqueta de digoxigenina como asa, y se retira el exceso de especificador por lavado. A continuación, el material lavado se usa para la segunda hibridación.

En la segunda hibridación, se mezclan los especificadores aislados con marcas. Las marcas se encuentran en exceso con respecto a los especificadores y la cinética es similar a la indicada anteriormente para la primera hibridación, y se lleva a cabo a una velocidad todavía mayor, porque la complejidad - N - es muy baja. Los complejos hibridados que contienen especificadores y marcas se pueden aislar usando una etiqueta de biotina en los especificadores como asa, procesándolos adicionalmente para la detección.

La formación de híbridos macromoleculares depende de diversas condiciones conocidas en la técnica, incluidos la temperatura, la concentración de sales y el pH. En la técnica se conocen bien diferentes condiciones para la formación de híbridos de ácidos nucleicos y pueden ser encontradas, por ejemplo, en Hames y Higgins, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991). Además, en la técnica se conocen bien las condiciones para las interacciones de ácido nucleico-proteína y proteína-proteína, que se pueden encontrar, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology* (ed. Ausubel *et al.*, Greene Publ., Nueva York (1989)), que se incorpora a este documento por referencia.

Los complejos "especificador-marca" se pueden separar entre sí, por ejemplo, extendiéndolos sobre una superficie bidimensional tal como un vidrio, o dividiéndolos en gotas líquidas en un citómetro de flujo. En este ejemplo, la visualización se puede lograr escaneando la superficie bidimensional o por citometría de flujo. La co-localización de marcas específicas determinará la identidad del especificador particular, que determinará la identidad del analito particular fijado inicialmente por el especificador.

Los complejos "especificador-marca" se pueden detectar por medio de diversos dispositivos que incluyen, sin estar limitados a ellos, la inspección visual, cámaras digitales, cámaras de vídeo, película fotográfica, o el uso de los instrumentos habituales tales como dispositivos de escaneo láser, fluorómetros, luminómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, lectores de placa, microscopios de epifluorescencia, microscopios de barrido, microscopios confocales, o por otros medios para amplificar la señal, tales como el tubo fotomultiplicador u otro detector de luz capaz de detectar la presencia, localización, intensidad, espectros de excitación y emisión, polarización de la fluorescencia, duración de la fluorescencia y otras propiedades físicas de la señal fluorescente. Las señales no fluorescentes se pueden detectar usando un contador Geiger, contadores de gammagrafía, quimioluminiscencia, ensayos enzimáticos y autorradiografía.

## ES 2 316 603 T3

Un ejemplo de método de detección que se puede usar en la invención es el de la cámara CCD (dispositivo de cargas interconectadas, sigla en inglés). El uso de este método exige que los complejos de especificador-marca se diseminen, en primer lugar, sobre una lámina de vidrio. Dado que todos los complejos tendrán aproximadamente la misma intensidad total, esto simplifica la detección, porque la cámara se puede ajustar a máxima sensibilidad (ganancia máxima) e intervalo dinámico mínimo.

Por ejemplo, si se utilizan dendrímeros fluorescentes para marcar, la muestra se puede excitar al nivel máximo correspondiente de absorción y ser escaneada al correspondiente nivel máximo de emisión de cada uno de los, por ejemplo, 8-10 fluoróforos usados. Un beneficio de las cámaras CCD es que utilizan rangos de detección muy amplios, lo que permite seleccionar fluoróforos con picos de emisión distantes. Las cámaras CCD de capa delgada pueden detectar desde rayos X de baja energía hasta el espectro próximo al infrarrojo.

De forma alternativa, si se utilizan nanopartículas, la muestra se puede iluminar con luz blanca angular y la detección tiene lugar a unas longitudes de onda escasas. El número de longitudes de onda dependerá de la calidad de la cámara usada y de su sensibilidad y linealidad. Las cámaras de buena calidad pueden distinguir de manera reproducible millones de colores con únicamente los tres filtros convencionales (rojo, verde y azul).

En el caso de marcas exclusivas que contienen más de un monómero de marca, se puede determinar la señal global generada por la marca exclusiva. Por ejemplo, la señal global para una marca exclusiva que contiene varios fluoróforos se puede determinar usando un espectrómetro. Además de detectar una señal global generada por la marca exclusiva, la invención proporciona la determinación de la localización espacial de las marcas iniciales (que pueden ser monómeros de marca o combinación de monómeros de marca) dentro de una marca exclusiva. Por ejemplo, las marcas dentro de una marca exclusiva se pueden separar entre sí usando una técnica de estiramiento de flujo ("*flow-stretch technique*") (Henegariu *et al.*, *Bio-techniques* 31: 246-250 (2001)), una técnica de "*receding meniscus*" (Yokota *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:1064-1070 (1997)), o una técnica de electro-estiramiento (Matsuura *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 29:E79 (2001)).

El uso de las técnicas de estiramiento de flujo, "*receding meniscus*" o electro-estiramiento permite separar las marcas en el interior de una marca exclusiva, de modo que es posible determinar espacialmente dónde está localizada una marca particular en la marca exclusiva (Ejemplos V, VI, VII y VIII). Por lo tanto, las marcas exclusivas que tienen la misma combinación de marcas iniciales y la misma señal global se pueden diferenciar entre sí en base a la localización de esas marcas dentro de la marca exclusiva. Esta capacidad de localizar la posición de una marca dentro de una marca exclusiva permite utilizar la posición de la marca inicial como característica distintiva cuando se genera un conjunto de marcas exclusivas. Por lo tanto, es posible generar un conjunto complejo de marcas exclusivas usando la misma combinación de marcas iniciales, variando la posición de las marcas dentro de una marca exclusiva.

Una señal observada puede ser modificada usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una señal observada puede incluir la sustracción del ruido inespecífico. Asimismo, una señal observada puede incluir, por ejemplo, el tratamiento de la cantidad medida por análisis convencional de los datos y procedimientos estadísticos que permiten establecer una comparación y análisis coherentes de los valores observados. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, la homología para una comparación directa de valores que tienen diferentes escalas, y el filtrado para separar valores aberrantes o artefactuales.

En el primer tipo de hibridación descrita anteriormente, entre una mezcla compleja de analitos y una población de especificadores, estos últimos se encontraban en exceso. Por el contrario, la hibridación sobre micromatrices convencionales tiene lugar bajo condiciones en las que el analito está en exceso, comparado con la sonda marcada. Además, en las micromatrices sólo una pequeña fracción de esta sonda hibridará realmente con la diana cognada en el transcurso de la hibridación, por lo que la cobertura de la diana al final del experimento es, habitualmente, menor que 5%. La cobertura de la diana usando los métodos de la invención es, en teoría, de 100%, porque la marca está en exceso en comparación con el analito diana.

Una de las ventajas de la cobertura de 100% de la diana es que permite contar directamente los analitos diana, puesto que cada uno de ellos se encuentra fijado a una marca. Usando los métodos de la invención, es posible contar directamente especies moleculares una a una. El recuento directo, o un registro digital de salida, es preferible a los métodos de cuantificación indirecta usados para las micromatrices, porque no es necesario que los datos sean sometidos a diversas transformaciones intermedias. Si el equipo de detección puede contar directamente el número de partículas emitidas, se dice que tiene un registro digital de salida; sin embargo, si los recuentos directos se someten a diversas transformaciones intermedias, entonces los datos tienen un registro de salida analógico. Se sabe que los datos de cuantificación de las micromatrices sufren varias distorsiones debido a la extrapolación de datos.

Otra consecuencia de la baja cobertura de la diana en las micromatrices es que se requiere un equipo altamente sensible para detectar la baja cantidad de la señal. No obstante, puesto que las micromatrices necesitan un gran intervalo dinámico para la detección de señales, la sensibilidad disminuye a causa del compromiso que debe establecerse entre sensibilidad e intervalo dinámico. Los métodos según la invención usan un número limitado de marcas para crear un gran número de combinaciones de marcas exclusivas. Esto permite que los métodos de detección operen dentro de un estrecho intervalo dinámico. Por el contrario, los métodos de micromatrices exigen un elevado intervalo dinámico (4 órdenes de magnitud o más) para explicar las grandes diferencias en la abundancia de las diferentes especies moleculares. Los bajos requisitos en términos de intervalo dinámico de los métodos de la invención mejorarán la sensibilidad del sistema, dado que se evita el compromiso entre sensibilidad e intervalo dinámico.



## ES 2 316 603 T3

Al objeto de preparar 10.000 especificadores únicos, se sintetizan cuarenta *genedigits* diferentes, que se dividen en 4 grupos que contienen 10 *genedigits* cada uno. Los *genedigits* de cada grupo tienen una etiqueta de 5 pares de bases en cada extremo. Un *genedigit* de cada grupo se encuentra presente en cada especificador. Los *genedigits* se enlazan con ayuda de oligonucleótidos 10mer adaptadores que son complementarios con las etiquetas de 5 pares de bases comunes para cada grupo. De este modo, para un especificador con 4 *genedigits*, habrá  $10 \times 10 \times 10 \times 10 = 10.000$  combinaciones posibles. Todos los especificadores contienen también una etiqueta de biotina.

El *genedigit* actúa como punto de unión para una marca y, por lo tanto, el número de marcas sintetizadas corresponde al número de *genedigits*. Los *genedigits* se marcan mediante el uso de anti-*genedigits*. Una secuencia de anti-*genedigits*, consistente en 3 repeticiones de 8 pares de bases, complementaria con la repetición central de 8 pares de bases del *genedigit* correspondiente, se liga al tallo de un dendrímero marcado (del Ejemplo I).

El anti-*genedigit* marcado de 24 pares de bases hibrida con la secuencia de *genedigit* de 40 pares de bases en el especificador en uno de los tres registros (véase la Figura 1C). De esta forma, cuando la marca hibrida con el especificador, lo hará a través de una secuencia de 24 pares de bases que tiene una complejidad de de una secuencia de 8 pares de bases solamente.

### Ejemplo III

#### *Análisis de Expresión de Genes Usando Especificadores*

Al objeto de determinar diferencia en la expresión de genes entre astrocitos y astrocitos activados por LPS, se aísla ARN de ambas poblaciones de astrocitos, usando la lisis celular en guanidina isotiocinina o fenol/cloroformo. Se agrega una población de especificadores a cada muestra de ARN bajo condiciones aptas para la hibridación. Los complejos de ARNm-especificador se aíslan con perlas oligo dT y se lavan de manera exhaustiva para retirar el exceso de especificadores. Los especificadores se eluyen del ARNm mediante la digestión del ARNm con RNasa A. A continuación, se procesan los especificadores para marcado, como se describe en los Ejemplos I y II, y estas marcas se detectan usando una cámara CCD. El número de especificadores correspondientes a los ARNm específicos procedentes de astrocitos no tratados se compara, entonces, con el patrón de especificadores de los astrocitos tratados con LPS. Dado que se conoce la secuencia de la región específica para la diana del especificador, se identifican los genes que se expresan de manera diferente entre las dos muestras.

### Ejemplo IV

#### *Detección Microbiana Usando Especificadores*

La invención se puede utilizar para detectar cepas de microorganismos con secuencias conocidas en muestras biológicas. Se extrae el ADN total de una muestra de sangre de un paciente en el que se sospecha una infección microbiana. A continuación, el ADN total se etiqueta con digoxigenina. Se desnaturaliza el ADN y se hibrida con una población de especificadores que contienen regiones diana específicas para un microorganismo particular, o un conjunto de microorganismos, en un volumen reducido (0,01-2,0  $\mu$ l). Se aíslan los complejos de ADN de muestra-especificador usando anticuerpos anti-digoxigenina, y se lavan exhaustivamente para retirar el exceso de especificadores. A continuación, se procesan los especificadores para el marcado y obtención de imágenes, como se ha descrito anteriormente.

### Ejemplo V

#### *Configuración de la Marca*

Este ejemplo muestra una molécula de sonda de ADN (especificador) que contiene marcas separadas entre sí por una distancia suficiente para la resolución individual de las marcas (Figura 2). Por ejemplo, en el caso de marcas fluorescentes, esta separación espacial considerable entre las marcas permite la identificación espectral de cada marca individual.

Como se muestra en la Figura 2, se puede generar una sonda de ADN (especificador) que contiene cuatro marcas fluorescentes distintas. Estas marcas están separadas por una distancia de aproximadamente 1 micrómetro. En este ejemplo, las marcas están separadas por aproximadamente 2.000 a 3.000 bases de ADN, si bien se podrían utilizar también otros polímeros para separar las marcas.

Se puede generar una población diversa de marcas exclusivas variando la marca fluorescente en cada una de las cuatro localizaciones. Por ejemplo, se puede utilizar un conjunto de 10 fluoróforos distintos para generar 10.000 marcas exclusivas. De manera específica, para una sonda con cuatro marcas diferentes, habrá  $10 \times 10 \times 10 \times 10 = 10.000$  combinaciones posibles. De manera similar, para una sonda que tenga cinco marcas diferentes, habrá 100.000 combinaciones posibles.

## Ejemplo VI

*Separación de las Marcas por Estiramiento de Flujo (“Flow-Stretch”)*

5 Este ejemplo muestra una molécula de sonda de ADN (especificador) con un monómero de marca que ha sido estirado sobre un cubre-objeto usando la técnica de “*flow-stretch*”. La técnica de “estiramiento de flujo” se puede usar también para una molécula de sonda con múltiples monómeros de marca a lo largo de la molécula de sonda.

10 Se construyó una sonda de ADN de cadena doble, con una sección monocatenaria en una localización deseada para la fijación de la marca. En este ejemplo, la sección monocatenaria se encuentra al final de la molécula de sonda. La molécula de marca contiene aproximadamente 300 fluoróforos Cy3 y una sección de ADN que es complementaria con el área monocatenaria de la molécula de sonda. Tras la hibridación, la molécula de sonda se tiñe con tinción YOYO1 para verificar que la marca está unida a la sonda. El procedimiento de tinción no es necesario cuando hay múltiples marcas unidas. Las sondas con marcas hibridadas se estiran, seguidamente, sobre un cubre-objeto usando la técnica de “estiramiento de flujo” (Henegariu *et al.*, véase antes). Se obtuvo una imagen, Figura 3, usando el microscopio de fluorescencia inversa. Las sondas se pueden estirar también usando la técnica de “*receding meniscus*” (Yokota *et al.*, véase antes).

## 20 Ejemplo VII

*Separación de las Marcas por Electro-Estiramiento (“Electro-Stretch”)*

25 Este ejemplo demuestra que se puede utilizar un campo eléctrico para alinear las moléculas de sonda (especificador) unidas a la superficie por un extremo. De este modo, las marcas que se encuentran a lo largo de la molécula de sonda están separadas espacialmente.

30 Se construyó una celda de flujo que permitió la obtención de imágenes de las moléculas de sonda a través de un cubre-objeto. La celda de flujo permitió, igualmente, el intercambio de soluciones y la aplicación de un campo eléctrico. Para evitar el burbujeo, se utilizó un gel para separar los electrodos de la solución. Con la separación por gel de los electrodos y la solución, es posible aplicar voltajes más altos, que mejoran la alineación de las moléculas de sonda. El cubre-objeto se recubrió con albúmina de suero bovino (BSA) para minimizar la unión inespecífica. Se agregó ADN al cubre-objeto y se fijó al mismo principalmente por medio de los extremos del ADN. Se retiró por lavado el ADN no fijado, y el ADN fijado restante se tiñó con YOYO1. La obtención de imágenes se llevó a cabo usando un microscopio epi-fluorescente. Al apagar el voltaje, se puede ver el ADN estirado desplazándose de forma aleatoria (Figura 4A). Sin embargo, con el voltaje activado, el ADN se alinea (Figura 4B).

## 40 Ejemplo VIII

*Detección de las Marcas por Citometría*

45 Otra forma de alinear las sondas de ADN (especificador) espacialmente es usando una constricción del flujo de un líquido que contiene el ADN, junto con un campo eléctrico oscilante (Asbury, C.L. y van den Engh, G., *Biophys. J.* 74: 1024-1030 (1998)). De esta forma, cuando la molécula de sonda pasa a través del punto de constricción, las marcas se separan espacialmente (Figura 5). La óptica confocal puede permitir la detección con una resolución espacial suficiente para determinar la secuencia de las marcas.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva, que comprende treinta o más sondas de ácido nucleico específicas para la diana, cada una de ellas unida a una marca exclusiva fijada a un ácido nucleico, en donde cada sonda de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que comprende una región específica para la diana y una región que comprende *genedigits*, en donde dichos *genedigits* son regiones de ácido nucleico de secuencias nucleotídicas predeterminadas que se unen específicamente a secuencias nucleotídicas de anti-*genedigit* complementarias, estando cada secuencia nucleotídica de anti-*genedigits* unida a un monómero de marca o a una combinación de monómeros de marca, en donde la población se encuentra en solución, y en donde la marca tiene una señal detectable que es fluorescente, luminiscente, colorimétrica, de voltaje, corriente o un campo magnético.
- 10 2. La población diversa según la reivindicación 1, que comprende treinta o más sondas de ácido nucleico específicas para la diana, en donde cada sonda de ácido nucleico comprende cuatro o múltiples *genedigits*, en donde dichos *genedigits* son regiones de ácido nucleico de secuencias nucleotídicas predeterminadas que se unen específicamente a secuencias nucleotídicas de anti-*genedigit* complementarias, estando cada secuencia nucleotídica de anti-*genedigits* unida a un monómero de marca o a una combinación de monómeros de marca, en donde la población se encuentra en solución, y en donde la marca tiene una señal detectable que es fluorescente, luminiscente, colorimétrica, de voltaje, corriente o un campo magnético.
- 15 3. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde cada sonda es sintética.
- 20 4. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cada sonda es ADN unido a un ácido nucleico que actúa como puente.
- 25 5. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos monómeros de marca están unidos a dendrímeros.
- 30 6. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los *genedigits* son ADN.
7. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las sondas comprenden etiquetas.
- 35 8. La población diversa según la reivindicación 7, en donde las etiquetas son etiquetas de biotina.
9. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde se usa un punto cuántico como monómero de marca.
- 40 10. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde se usa un fluoróforo como monómero de marca.
11. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende 50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000,  $1 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  o más sondas de ácido nucleico diferentes.
- 45 12. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las sondas de ácido nucleico están separadas entre sí.
13. La población diversa según la reivindicación 12, en donde las sondas de ácido nucleico están diseminadas sobre una superficie bidimensional.
- 50 14. La población diversa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde una o múltiples de las sondas específicas para la diana están hibridadas con un analito, y en donde la señal de la sonda específica para la diana hibridada identifica de manera exclusiva el analito.
- 55 15. Un método para detectar un analito de ácido nucleico, que comprende:
- a) hacer contactar una mezcla de analitos de ácido nucleico con la población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, bajo condiciones suficientes para la hibridación de las sondas con los analitos de ácido nucleico diana, y
- 60 b) medir la señal resultante de una o múltiples de las sondas específicas para la diana hibridadas con un analito, en donde la señal identifica de forma exclusiva el analito.
16. Un método para cuantificar un analito de ácido nucleico, que comprende:
- 65 a) hacer contactar una mezcla de analitos de ácido nucleico con la población diversa de sondas marcadas de forma exclusiva, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, bajo condiciones suficientes para la hibridación de las sondas con los analitos de ácido nucleico diana;

## ES 2 316 603 T3

b) medir la señal resultante de una o múltiples de las sondas específicas para la diana hibridadas con un analito, en donde la señal identifica de manera exclusiva el analito, identificando de este modo el analito de ácido nucleico diana; y

5 c) contar las moléculas individuales del analito de ácido nucleico presentes en la muestra, cuantificando de esta forma el analito de ácido nucleico.

10 17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16, en donde se usa la posición del monómero de marca o de la combinación de monómeros de marca como característica distintiva.

15 18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde las sondas de ácido nucleico se someten a una técnica de “estiramiento de flujo” (*“flow-stretching”*), a una técnica de *“receding meniscus”*, a una técnica de electro-estiramiento, o a la constricción del flujo de un líquido que contiene dichas sondas de ácido nucleico, junto con un campo eléctrico oscilante.

20

25

30

35

40

45

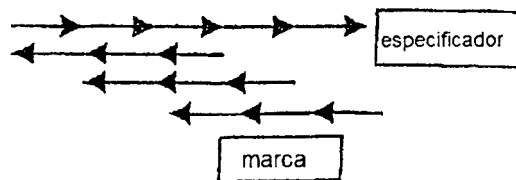
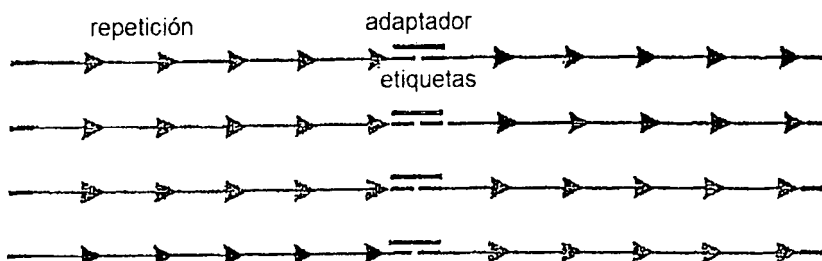
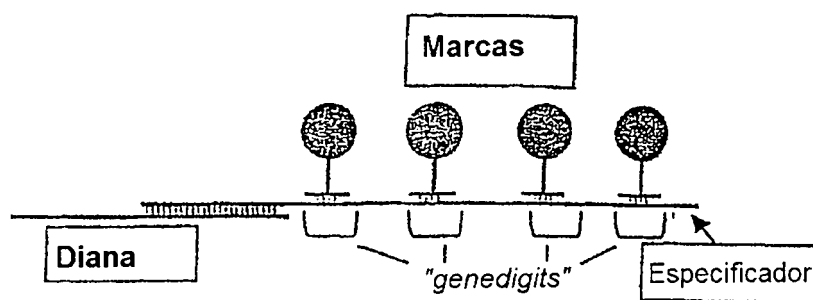
50

55

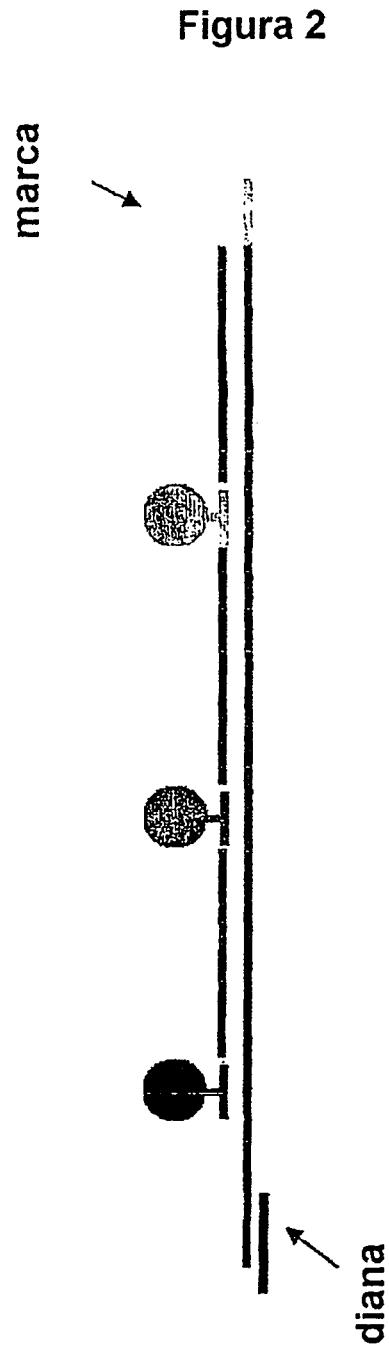
60

65

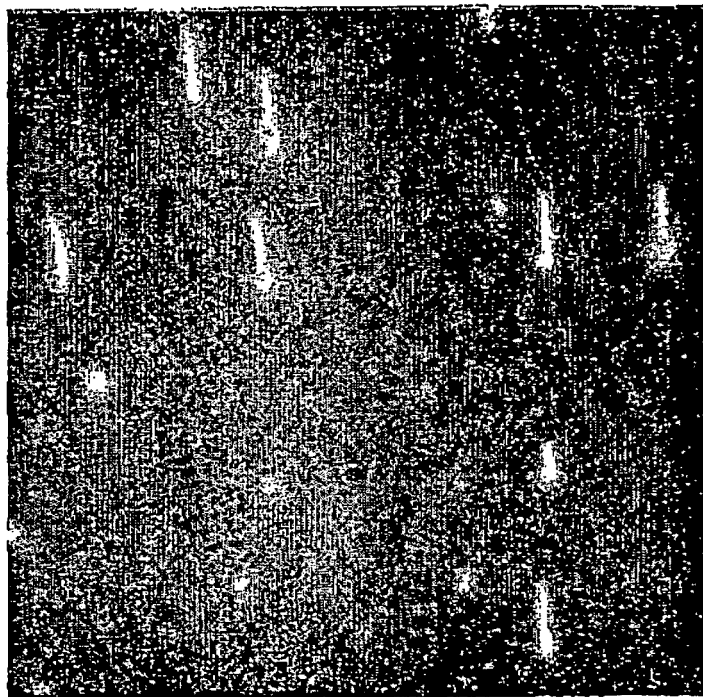
Figura 1



# Sonda de ADN (especificador)

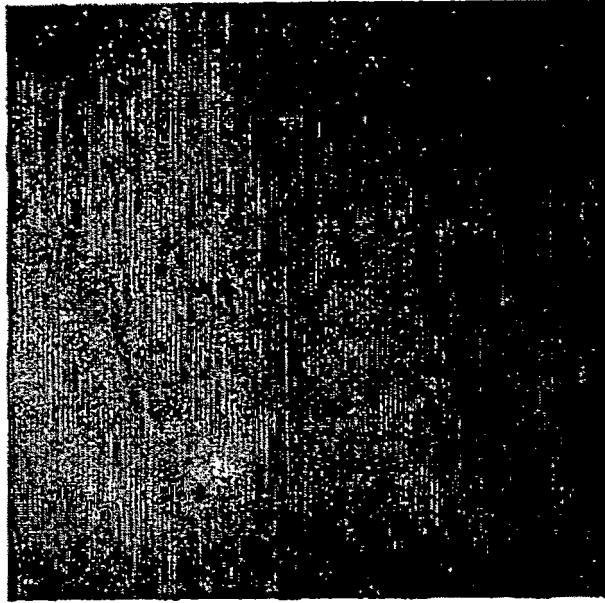


**Figura 3**

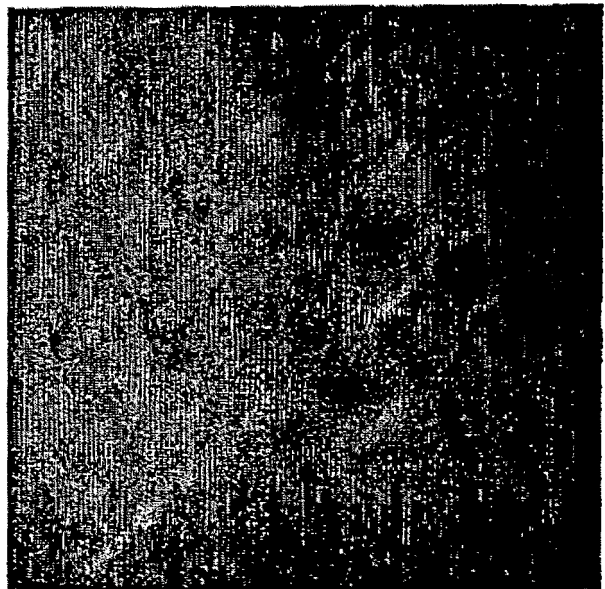


**Figura 4**

**A**

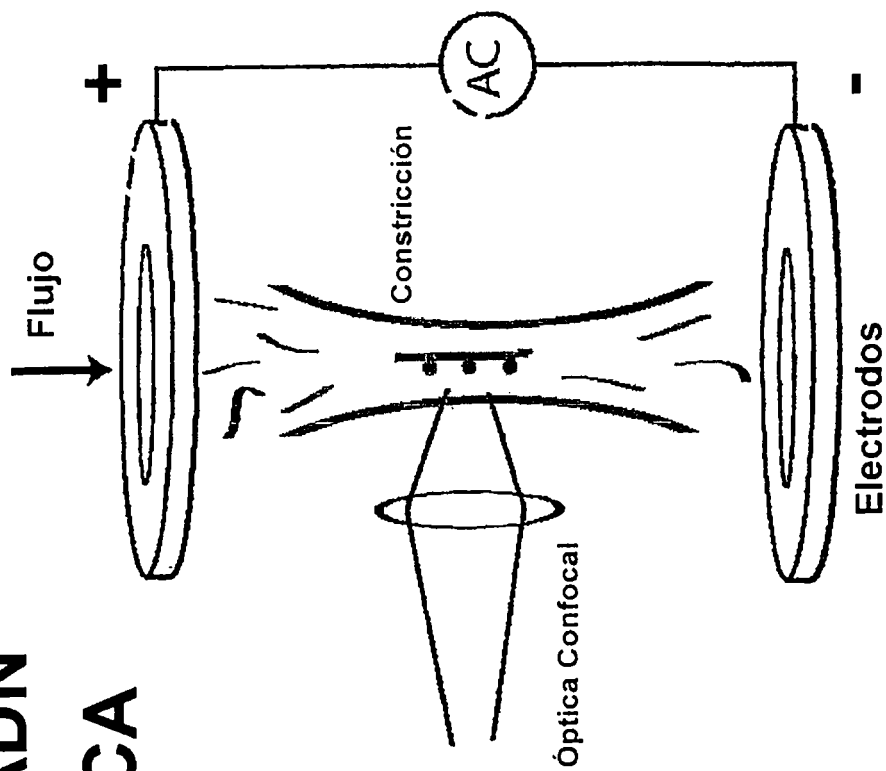


**B**



# Alineación de ADN en campo de CA

Figura 5



# ES 2 316 603 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Instituto de Biología de los Sistemas  
Dimitrov, Krassen  
5 Dunaway, Dwayne
- <120> Métodos de Detección y Cuantificación de Analitos en Mezclas Complejas
- 10 <130> FP-IS 5320
- <140> documento PCT/US02/21278  
<141> 2002-07-03
- 15 <150> Documento US09/898.743  
<151> 2001-07-03
- 20 <160> 11
- <170> FastSEQ para Windows, Versión 4.0  
<210> 1
- 25 <211> 220  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>  
<223> Cebador Sintético
- 35 <400> 1
- |            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | 60  |
| actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | 120 |
| actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | 180 |
| actctctctc | tctctctctc | gctctctctc | tctctctctc |            |            | 220 |
- 40
- <210> 2  
<211> 220
- 45 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Cebador Sintético
- 50 <400> 2
- |            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | 60  |
| actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | 120 |
| actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | actctctctc | tctctctctc | 180 |
| gctctctctc | tctctctctc | gctctctctc | tctctctctc |            |            | 220 |
- 60
- <210> 3  
<211> 220
- 65 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

# ES 2 316 603 T3

<220>

<223> Cebador Sintético

5 <400> 3

10           actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 60  
          actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 120  
          actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                           220

<210> 4

<211> 220

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cebador Sintético

<400> 4

25           actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 60  
          actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 120  
          actctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                           220

30

<210> 5

<211> 220

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Cebador Sintético

<400> 5

45           actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 60  
          actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 120  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                           220

50 <210> 6

<211> 220

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Cebador Sintético

60 <400> 6

65           actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 60  
          actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 120  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                           220

# ES 2 316 603 T3

<210> 7  
<211> 220  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador Sintético  
10  
<400> 7

```
15      actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 60
      actctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 120
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                                220
```

20 <210> 8  
<211> 220  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Cebador Sintético  
30 <400> 8

```
35      actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc 60
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 120
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                                220
```

40 <210> 9  
<211> 220  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Cebador Sintético  
50 <400> 9

```
55      actctctctc tctctctctc actctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 60
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 120
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180
      gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                                220
```

60 <210> 10  
<211> 220  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>  
<223> Cebador Sintético

# ES 2 316 603 T3

<400> 10

5           actctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 60  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 120  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc 180  
          gctctctctc tctctctctc gctctctctc tctctctctc                           220

10 <210> 11

<211> 10

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Sintético

20 <400> 11

gagagagaga

10

25

30

35

40

45

50

55

60

65