

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 728**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6804 (2008.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/6816 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012** **E 18173059 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3425063**

54 Título: **Métodos para la detección de analitos**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161579265 P

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

03.11.2023

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (100.0%)**

**17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**LEVNER, DANIEL;
LEE, JEHYUK;
CHURCH, GEORGE M. y
SUPER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 952 728 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 para la detección de analitos

Apoyo del gobierno

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el acuerdo HG005550 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo técnico de la divulgación

La invención proporcionada en el presente documento se refiere a un método para la detección, identificación y/o cuantificación de analitos de una célula o tejido *in situ*.

Antecedentes

10 La necesidad de técnicas de multiplexación en biología a menudo se debe al hecho de que las muestras de prueba son valiosas y quienes las analizan no saben de antemano qué buscar con precisión o deben extraer la mayor cantidad de información de una sola muestra. Por lo tanto, es deseable que los médicos clínicos y los investigadores sometan cada muestra a un gran conjunto de sondas.

15 La lectura óptica es común en biología y puede ser muy efectiva. Sin embargo, normalmente se limita a un número relativamente pequeño de fluoróforos o cromóforos disponibles (que se denominan colectivamente colores). En la práctica, la multiplexación por fluorescencia a menudo se limita a 4 o 5 colores, lo que por métodos tradicionales implica que como máximo se pueden detectar 4 o 5 sondas en una sola muestra.

20 El enfoque común para mejorar la multiplexación en los métodos ópticos es aumentar el número de colores disponibles. Con este fin, se han desarrollado puntos cuánticos para proporcionar una mayor gama de colores. Sin embargo, en realidad, es difícil usar más de 6 colores de puntos cuánticos simultáneamente. Otro enfoque es usar mezclas o proporciones de fluoróforos como nuevos colores. Dichos métodos han extendido la multiplexación a cientos de analitos, pero debido al tamaño de los marcadores (por ejemplo, microperlas), la tecnología hasta ahora se ha limitado a análisis basados en citometría de flujo. Otro enfoque más implica nanocadenas, que son esencialmente cadenas cortas de fluoróforos ensartados que crean códigos de barras de colores visibles. Desafortunadamente, la lectura de nanocadenas requiere imágenes de muy alta resolución y un aparato de flujo especial. Además, las nanocadenas solo se pueden usar en una muestra donde los objetivos de las sondas son escasos, o los códigos de barras se superpondrán y crearán un desenfoque.

25 El documento US 2011/245111 A1 se refiere a un sistema de ensayo que comprende un ensayo capaz de altos niveles de multiplexación donde los reactivos se proporcionan a una muestra biológica en patrones espaciales definidos; instrumentación capaz de suministro controlado de reactivos de acuerdo con los patrones espaciales; y un esquema de decodificación que proporciona una lectura que es de naturaleza digital. El documento US 2003/148335 A1 divulga métodos y composiciones para ensayar una pluralidad de objetivos diferentes de ácidos nucleicos o para ensayar actividades de una pluralidad de enzimas usando, entre otras cosas, marcadores de identificación (ID) de oligonucleótidos.

30 Una solución sencilla para el número limitado de colores (p. ej., 4 o 5 colores) en las lecturas ópticas es repetir el sondeo de la misma muestra con varios conjuntos pequeños de sondas diferentes. Por ejemplo, el ensayo puede implicar sondear la muestra con 4 anticuerpos diferentes a la vez y generar imágenes después de cada ensayo. Si la prueba requiere sondear la muestra con un total de 64 anticuerpos, el procedimiento de 4 sondas tendría que repetirse 16 veces usando la muestra. Como tal, es posible que se deba priorizar el orden de detección de diferentes analitos objetivo en una sola muestra, ya que algunos analitos objetivo en la muestra pueden degradarse durante los sondeos sucesivos. En consecuencia, todavía existe una gran necesidad de métodos precisos y sensibles con un alto rendimiento para la detección, identificación y/o cuantificación de moléculas objetivo en una muestra, por ejemplo, mezclas complejas.

Resumen

45 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones proporcionadas en el presente documento se basan, al menos en parte, en el desarrollo de un análisis y lectura biológicos multiplexados, en los que una multitud de reactivos de detección que comprenden una o más sondas y/o tipos de sonda se aplican a una muestra, lo que permite que los reactivos de detección se unan a las moléculas o analitos objetivo, que luego pueden identificarse. En consecuencia, en este documento se proporcionan métodos para detectar múltiples analitos de una célula o tejido *in situ*.

50 En consecuencia, un aspecto proporcionado en este documento se refiere a un método para identificar una pluralidad de analitos de una célula o tejido *in situ*.

El método descrito en este documento pero que no define la invención reivindicada, comprende: (a) poner en contacto la célula o el tejido con una composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección como se describe

en el presente documento, en el que un reactivo de detección de dicha pluralidad de reactivos de detección comprende (i) al menos una sonda dirigida a un analito de dicha pluralidad de analitos y (ii) al menos un marcador de ácido nucleico que comprende una pluralidad de subsecuencias predeterminadas, en el que dicha al menos una sonda y dicho al menos un marcador de ácido nucleico están conjugados entre sí; (b) eliminar cualquier reactivo de detección no unido de dicha célula o tejido; (c) mientras dicho reactivo de detección está unido a dicho analito de dicha célula o tejido, secuenciar dicha pluralidad de subsecuencias predeterminadas *in situ*; (d) usar dicha pluralidad de subsecuencias predeterminadas identificadas en (c) para identificar dicho analito.

En algunas realizaciones, la célula o tejido puede ser una célula o tejido fijado.

En algunas realizaciones, el reactivo de detección puede ser de una pluralidad de reactivos de detección que tienen sondas que se dirigen a diferentes analitos.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además el procesamiento de la célula o tejido antes de ponerla en contacto con la composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, el procesamiento puede comprender el procesamiento mecánico de dicha célula o tejido, la adición de al menos un reactivo a dicha célula o tejido, la separación de dicha célula o tejido, el montaje de dicha célula o tejido en un soporte sólido, la fijación de dicha célula o tejido, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula hematopoyética, una célula neural, una célula mesenquimatosa, una célula cutánea, una célula de la mucosa, una célula del estroma, una célula muscular del bazo, una célula reticuloendotelial, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula hepática, una célula renal, una célula gastrointestinal, una célula pulmonar o una célula T.

En algunas realizaciones, al menos una sonda y el marcador de ácido nucleico pueden conjugarse entre sí mediante al menos un enlazador. El al menos un enlazador puede ser un enlace, una molécula enlazadora, un enlazador multivalente o una partícula.

La al menos una sonda puede incluir un ácido nucleico, un anticuerpo o una porción del mismo, una molécula similar a un anticuerpo, una enzima, una célula, un virus, un antígeno, una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un peptidomimético, un azúcar, un lípido, un glicano, una glicoproteína, un aptámero y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla, bicatenario, parcialmente bicatenario, una horquilla, lineal, circular, ramificado, un concatémero (p. ej., un concatémero con una estructura tridimensional tal como una rona, es decir, una colonia de círculo rodante o una nanobola de ADN), o cualquier combinación de los mismos.

Las subsecuencias predeterminadas con el marcador de ácido nucleico pueden conjugarse entre sí mediante al menos un enlazador de secuencia. En algunas realizaciones, el enlazador de secuencias puede ser un enlace directo, por ejemplo, un enlace fosfoéster, que puede permitir la conjugación de las subsecuencias predeterminadas para formar una secuencia contigua más larga. En algunas realizaciones, el enlazador de secuencia puede ser un enlazador nucleotídico. El enlazador nucleotídico, en algunas realizaciones, puede ser de cadena sencilla, bicatenario, parcialmente bicatenario, una horquilla o cualquiera de sus combinaciones, opcionalmente en el que dicho enlazador nucleotídico comprende una pluralidad de nucleótidos.

Dependiendo de varias aplicaciones y/o condiciones de ensayo (p. ej., sensibilidad, volumen/concentración de la muestra), el reactivo de detección puede comprender una sonda y una pluralidad de marcadores de ácido nucleico. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, en otras realizaciones, el reactivo de detección puede comprender una pluralidad de sondas y un marcador de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el reactivo de detección puede comprender una pluralidad de sondas y una pluralidad de marcadores de ácido nucleico.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra tres realizaciones diferentes de los reactivos de detección descritos en el presente documento que producen lecturas de secuenciación distintas. Anticuerpos específicos de patógenos (p. ej., anti-*E-Coli*, anti-*S. aureus* y anti-*C. albicans*) se conjugan individualmente a una nanopartícula con al menos un marcador de ácido nucleico como se describe en este documento. De acuerdo con una o más realizaciones, la lectura del marcador de ácido nucleico puede tomar la forma de un conjunto de imágenes ópticas o lecturas puntuales, por ejemplo, de colores fluorescentes o visibles; la secuencia temporal de imágenes ópticas o lecturas puntuales se puede analizar computacionalmente para determinar la identidad del reactivo de sonda correspondiente, por ejemplo, un anticuerpo específico de patógeno.

La Figura 2 muestra tres realizaciones diferentes de los reactivos de detección descritos en el presente documento que producen lecturas de secuenciación distintas. Los oligonucleótidos de ADN complementarios a la expresión del ARN objetivo (p. ej., OCT4, SOX2 o KLF4) se conjugan individualmente con una nanopartícula con al menos un marcador de ácido nucleico como se describe en el presente documento. De acuerdo con una o más realizaciones, la

lectura del marcador de ácido nucleico puede tomar la forma de un conjunto de imágenes ópticas o lecturas puntuales, por ejemplo, de colores fluorescentes o visibles; la secuencia temporal de imágenes ópticas o lecturas puntuales se puede analizar computacionalmente para determinar la identidad del reactivo de sonda correspondiente, por ejemplo, un aptámero de ADN específico para una expresión de ARN.

La Figura 3 muestra ejemplos de formas de un marcador de ácido nucleico del reactivo de detección de acuerdo con una o más realizaciones descritas en el presente documento.

Las Figuras 4A y 4B muestran dos ejemplos de configuraciones de reactivos de sonda y marcadores de ácido nucleico en partículas, de acuerdo con una o más realizaciones descritas en el presente documento.

La Figura 5 muestra una realización de los reactivos de detección para un ejemplo de método de lectura basado en hibridación, de acuerdo con una o más realizaciones descritas en el presente documento. Anticuerpos específicos de patógenos (p. ej., anti-*C. albicans*) se conjugan individualmente con una nanopartícula que comprende al menos un marcador de ácido nucleico como se describe en el presente documento. De acuerdo con una o más realizaciones, la lectura del marcador de ácido nucleico puede determinarse hibridando con un pequeño número, por ejemplo, de sondas decodificadoras marcadas con fluorescencia, formación de imágenes y luego avanzando al siguiente conjunto de sondas decodificadoras. Para permitir que el marcador de secuencia (SeqTag) se lea rápidamente y sin el uso de enzimas o reacciones químicas, el oligonucleótido de ADN (SeqTag) está diseñado para incluir varios sitios de hibridación, cada uno de los cuales corresponde a una etapa de lectura en particular. En cada etapa de lectura, la muestra se somete a una mezcla de sondas de ADN marcadas con fluorescencia que potencialmente podrían unirse al sitio de hibridación de esa etapa. Cada uno de los sitios, sin embargo, está diseñado para unir solo una de estas sondas, revelando así el código de identificación de SeqTag.

Las Figuras 6A-6B muestran las imágenes de lectura de perlas DYNABEADS® (1 µm de tamaño) localizadas en una muestra usando un ejemplo de método de detección basado en hibridación. Cada perla se conjugó con una de las 6 marcadores de ácido nucleico, que a su vez se hibridaron con un conjunto diferente de sondas decodificadoras conjugadas con un marcador óptico verde, rojo o en blanco durante cada etapa de lectura (Figura 6A: etapa de lectura 1; Figura 6B: Etapa de lectura 2).

La Figura 7 es un conjunto de imágenes que muestran que cada una de las construcciones de moléculas de detección (marcadores SeqTag) tiñeron correctamente la levadura y emitieron fluorescencia de acuerdo con tres conjuntos predeterminados de sondas decodificadoras. Los marcadores SeqTag y los desplazadores de oligonucleótidos se aplicaron de la siguiente manera:

Etapa 1: Conjunto 1 solo sondas;

Etapa 2: Conjunto 1 Oligonucleótidos de desplazamiento y Conjunto 2 Sondas;

Etapa 3: Conjunto 2 Oligonucleótidos de desplazamiento y Conjunto 3 Sondas; y

Etapa 4: Conjunto 3 Oligonucleótidos de desplazamiento.

El marcador SeqTag y los colores correspondientes fueron los siguientes:

Serie 1: SeqTag 1: verde, SeqTag 2: rojo y SeqTag 3: azul;

Conjunto 2: SeqTag 4: verde, SeqTag 5: rojo y SeqTag 6: azul;

Conjunto 3: SeqTag 7 - Verde y SeqTag 8 - Rojo.

La Figura 8 muestra la lectura de SeqTag mediante un experimento de hibridación por desplazamiento de acuerdo con una realización del método descrito en el presente documento. Los marcadores de ADN SeqTag se incubaron en una micromatriz recubierta de estreptavidina. A continuación, esta micromatriz se expuso a una secuencia de sondas de detección marcadas con fluorescencia y oligonucleótidos de desplazamiento, de acuerdo con la lectura de hibridación por desplazamiento. Las imágenes de la matriz después de cada etapa de lectura demostraron la fluorescencia correspondiente al patrón esperado (que se muestra al lado de cada imagen).

La Figura 9 es una representación esquemática de la hibridación por desplazamiento de acuerdo con una realización del método. A medida que avanza la lectura, es necesario eliminar la fluorescencia de las etapas de lectura anteriores para no obstruir la señal de la etapa actual. Como se ilustra en la Fig. 9, esto se puede lograr utilizando un método de hibridación por desplazamiento: cada uno de los sitios de hibridación de SeqTag puede estar precedido por una secuencia corta de "punto de apoyo". Durante cada etapa de lectura, la muestra se somete a una mezcla de oligonucleótidos de ADN "desplazadores". Uno de estos desplazadores es complementario al sitio de hibridación de la etapa anterior y, con la ayuda del punto de apoyo, es capaz de desplazar la sonda fluorescente que estaba unida allí.

La Figura 10 es una representación esquemática de un reactivo de sonda de acuerdo con una realización descrita en el presente documento. Se muestra una construcción de oligonucleótido-anticuerpo-estreptavidina. Una forma conveniente y efectiva de marcar anticuerpos con SeqTag es a través de un puente de estreptavidina. El anticuerpo se biotinila y los oligonucleótidos de ADN de la sonda (SeqTag) se sintetizan con una modificación de 5'-biotina. Luego, aprovechando la forma tetramérica nativa de la estreptavidina, se unen tres cadenas de ADN a cada anticuerpo. A diferencia de los métodos de conjugación química, que pueden dañar el anticuerpo, este método resulta lo suficientemente suave como para preservar la función del anticuerpo. Como se muestra, una sola molécula de estreptavidina (2) está unida a tres de los mismos SeqTags de ADN (1) y un solo anticuerpo (3).

La Figura 11 es una representación esquemática de la detección de un analito por el anticuerpo marcado con SeqTag que se muestra en Figura 10.

La Figura 12 es una representación esquemática de los reactivos de detección para diferentes analitos. Como se muestra, a diferentes agentes infecciosos (analitos) se les puede asignar su propio código SeqTag para permitir la detección multiplexada de acuerdo con una realización descrita en este documento.

La Figura 13 es una representación esquemática de los reactivos de detección para hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de secuencia marcada (SeqTagged). FISH permite identificar microbios en función de su secuencia de ARN ribosómico. En el caso de FISH SeqTagged, la sonda de FISH y su SeqTag se pueden sintetizar como un solo oligonucleótido de ADN como se muestra. Las secuencias que se muestran son, de arriba a abajo, SEQ ID NO: 1 (5'-CCTACACACCAGCGTGCC-3', sonda para *K. pneumonia*); SEQ ID NO: 2 (5'-CCGCACTTTCATCTCCG-3', sonda para *H influenza*); y SEQ ID NO: 3 (GCCAAGGCTTATACTCGC, sonda para *C. albicans*).

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describen métodos, reactivos de detección (o moléculas de detección como se usan indistintamente en el presente documento) y kits (en el que los kits no forman parte de la invención) para detectar una pluralidad de analitos en una muestra. De acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento, un reactivo de sonda (p. ej., un anticuerpo o aptámeros) puede marcarse directa o indirectamente con un marcador de ácido nucleico. La información de ácido nucleico presente en el marcador de ácido nucleico se puede decodificar y/o detectar de manera secuencial en el tiempo. Los reactivos y métodos de detección descritos en este documento aumentan significativamente la cantidad de sondas diferentes (y los analitos correspondientes) que pueden detectarse simultáneamente en un ensayo multiplex, en comparación con un ensayo tradicional en el que cada sonda se marca solo con marcadores fluorescentes o puntos cuánticos y, por lo tanto, la multiplexación está limitada por la cantidad de colores disponibles y utilizables en la práctica. Además, debido a que los reactivos de detección descritos en el presente documento se detectan y/o generan imágenes en una serie temporal de etapas, la cantidad de sondas (y los analitos correspondientes) que se pueden detectar en un ensayo multiplex crece multiplicativamente con la cantidad de etapas de detección en una serie temporal y la cantidad de marcadores ópticos que se utilizan. Solo a modo de ejemplo, 3 conjuntos de imágenes en las que se usan 4 marcadores ópticos distintos pueden codificar $4 \times 4 \times 4 = 64$ reactivos de sonda distintos (por ejemplo, anticuerpos).

Métodos para detectar una pluralidad de analitos en una muestra

En el presente documento se describen métodos para detectar una pluralidad de analitos en una muestra, usando los reactivos de detección descritos en el presente documento. El método incluye (a) poner en contacto la muestra con una composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección (que se describirán en detalle más adelante), en el que cada subpoblación de reactivos de detección se dirige a al menos un analito diferente; y (b) detectar de manera secuencial en el tiempo dicha pluralidad de las subsecuencias predeterminadas de dichos reactivos de detección, en el que dicha detección de las subsecuencias genera cada una, una firma de señal correspondiente a dicha subsecuencia, y en el que un orden temporal de las firmas de señal correspondientes a dicha pluralidad de las subsecuencias de dicho reactivo de detección identifica una subpoblación de los reactivos de detección. En algunas realizaciones, la firma de señal es una firma temporal. En algunas realizaciones, la firma de señal puede comprender además una firma espacial. Un ejemplo no limitativo de una firma espacial incluye la ubicación espacial de una firma de señal.

En algunas realizaciones, el orden temporal de las firmas de señal correspondientes a la pluralidad de subsecuencias del reactivo de detección puede ser único para cada subpoblación de reactivos de detección. En algunas realizaciones, se pueden usar al menos dos o más firmas de señales para identificar la misma subpoblación de reactivos de detección.

En algunas realizaciones, un reactivo de detección descrito en el presente documento puede dirigirse a al menos dos (p. ej., al menos dos, al menos tres o más) analitos distintos. En algunas realizaciones, una primera subpoblación de reactivos de detección puede dirigirse a al menos un analito diferente del de una segunda subpoblación de reactivos de detección. Solo a modo de ejemplo, una primera subpoblación de reactivos de detección puede dirigirse a al menos al analito A y al analito B, mientras que una segunda subpoblación de reactivos de detección puede dirigirse a al menos al analito B y al analito C. La lectura de estos reactivos de detección puede ser distinta pero superpuesta. Por lo tanto, se pueden identificar diferentes analitos muestreándolos combinatoriamente y determinando cuál se une.

Como se usa en el presente documento, el término "orden temporal de las firmas de señal" se refiere a una secuencia de firmas de señales determinadas de manera secuencial en el tiempo, es decir, la secuencia de firmas de señales avanza mediante una serie de operaciones activas realizadas de manera secuencial en el tiempo, por ejemplo, utilizando un conjunto diferente de reactivos de decodificación o sondas de decodificación en cada operación activa. En algunas realizaciones, el uso de un conjunto de sondas decodificadoras en cada operación activa puede generar una firma de señal correspondiente a una subsecuencia de los reactivos de detección.

La composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección puede existir en cualquier formato. En algunas realizaciones, la composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección puede estar en forma de solución o suspensión que comprende los reactivos de detección. En dichas realizaciones, la composición puede comprender además al menos un agente. Por ejemplo, sin querer vincularse a ninguna teoría en particular, el agente puede ser un tampón de bloqueo, un tensioactivo, reactivos de sonda no conjugados, un estabilizador, un inhibidor de

enzimas o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones donde las composiciones se administran *in vivo*, la composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección puede estar contenida o inmovilizada en un dispositivo (p. ej., una jeringa o un dispositivo de microfluidos) o un recipiente de ensayo o reacción (p. ej., soportes sólidos tales como viales y placas de múltiples pocillos).

Como se usa allí, el término "poner en contacto" se refiere a cualquier medio adecuado para administrar o exponer una muestra a una pluralidad de los reactivos de detección descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el término "poner en contacto" se refiere a agregar los reactivos de detección (por ejemplo, suspendidos en una solución) directamente a la muestra. En algunas realizaciones, el término "poner en contacto" puede comprender además mezclar la muestra con los reactivos de detección por cualquier medio conocido en la técnica (p. ej., agitación tipo vórtice, pipeteo y/o agitación). En algunas realizaciones, el término "poner en contacto" puede comprender además incubar la muestra junto con los reactivos de detección durante un tiempo suficiente, por ejemplo, para permitir la unión de los reactivos de la sonda a los analitos objetivo. El tiempo de contacto puede ser de cualquier duración, de acuerdo con las afinidades de unión y/o las concentraciones de los reactivos de la sonda y/o los analitos, las concentraciones de los reactivos de detección y/o las condiciones de incubación (por ejemplo, la temperatura). Por ejemplo, el tiempo de contacto se puede reducir si la muestra y los reactivos de detección se incuban a una temperatura más alta. En algunas realizaciones, el tiempo de contacto entre la muestra y los reactivos de detección puede ser de al menos aproximadamente 30 segundos, al menos aproximadamente 1 minuto, al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 15 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 48 horas o más. Un experto en la técnica puede ajustar el tiempo de contacto en consecuencia.

Para aplicaciones *in vivo*, el término "contacto" puede referirse a la administración de reactivos de detección a un sujeto, por ejemplo, por administración oral o por inyección.

La muestra puede ponerse en contacto con al menos un tipo de reactivos de detección. En algunas realizaciones, la muestra puede ponerse en contacto con al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más tipos diferentes de los reactivos de detección. En algunas realizaciones, la muestra puede ponerse en contacto con al menos 100, al menos 500, al menos 1,000, al menos 5000, al menos 10,000, al menos 50,000, al menos 100,000 o más tipos diferentes de reactivos de detección. Varios tipos de reactivos de detección descritos en este documento pueden diferir en los tipos de reactivos de sonda (p. ej., ácidos nucleicos frente a anticuerpos), dominios de unión al objetivo y/o analitos objetivo.

En algunas realizaciones, el método descrito en el presente documento puede comprender además procesar la muestra antes de ponerla en contacto con la composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección descritos en el presente documento. Dependiendo de los tipos y/o naturaleza de las muestras y/o analitos, se pueden usar diferentes técnicas de procesamiento de muestras con los métodos descritos en este documento. Ejemplos de técnicas de procesamiento de muestras incluyen, pero no se limitan a, procesamiento mecánico de una muestra (p. ej., sin limitaciones, homogeneización, centrifugación, agitación tipo vórtice, seccionamiento y cizallamiento), adición de al menos un reactivo a una muestra (p. ej., sin limitaciones, tampones de lisis, reactivos de extracción de ARN o ADN, reactivos de digestión de ARN o ADN, inhibidores de enzimas, agentes de fijación, disolventes orgánicos, anticuerpos, agentes de permeabilización y agentes de inmunohistoquímica), separación de una muestra (p. ej., sin limitaciones, filtrado, centrifugado, electroforesis, transferencia Western y transferencia Northern), montaje de una muestra en un soporte sólido (p. ej., un portaobjetos de microscopio) y cualquier combinación de los mismos.

Solo a modo de ejemplo, si una muestra es un tejido de un sujeto (p. ej., una biopsia para inmunotinción), el procesamiento de la muestra puede incluir, pero sin limitarse a, seccionamiento de tejido, montaje en un soporte sólido, fijación del tejido, permeabilización del tejido (si se van a detectar proteínas intracelulares), bloqueo de reacciones no específicas con los reactivos de detección. En algunas realizaciones, las proteínas o los ácidos nucleicos pueden aislarse de una muestra de tejido o fluido y luego separarse electroforéticamente en un medio de separación (p. ej., gel de electroforesis), seguido de la transferencia de las proteínas o los ácidos nucleicos a una membrana de transferencia. Las membranas de transferencia que contienen proteínas o ácidos nucleicos pueden entonces ponerse en contacto con los reactivos de detección descritos en este documento. Los métodos de procesamiento de muestras antes de la adición de varios tipos de reactivos de sonda para diferentes tipos de ensayos están bien establecidos en la técnica, y cualquiera de esos métodos se puede realizar antes de la etapa de contacto de los métodos descritos en este documento.

En algunas realizaciones, el método descrito en el presente documento puede comprender además la eliminación de cualquier reactivo de detección no unido antes de la detección de las subsecuencias predeterminadas de manera secuencial en el tiempo. El término "reactivos de detección no unidos" como se usa en el presente documento se refiere a reactivos de detección que no se han unido o interactuado con los analitos objetivo. Los reactivos de detección no unidos se pueden eliminar de la muestra mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo,

enjuagando la muestra con una solución tamponada al menos una vez, al menos dos veces, al menos tres veces o más.

Después de que los reactivos de detección se unen a los analitos objetivo en una muestra, los marcadores de ácido nucleico de los reactivos de detección que contienen información de ácido nucleico se pueden decodificar para permitir la identificación del respectivo reactivo o reactivos de sonda conjugados con ellos, a diferencia de las tecnologías de marcado óptico tradicionales, en las que se detecta una firma óptica, tal como un fluoróforo, sin proporcionar ninguna información de ácido nucleico. En realizaciones, las subsecuencias predeterminadas dentro de los marcadores de ácido nucleico se detectan de manera secuencial en el tiempo. El término "manera secuencial temporal" se usa en referencia a detectar o decodificar en una serie de tiempo una pluralidad de subsecuencias predeterminadas dentro de los marcadores de ácido nucleico de cualquier reactivo de detección que se une a los analitos objetivo en una muestra. En algunas realizaciones, una o más subsecuencias predeterminadas dentro de al menos un marcador de ácido nucleico de cada reactivo de detección pueden detectarse o decodificarse en cada punto de tiempo o etapa de detección de una serie de tiempo. En algunas realizaciones, una subsecuencia predeterminada dentro de al menos un marcador de ácido nucleico de cada reactivo de detección puede detectarse o decodificarse en cada punto de tiempo o etapa de detección de una serie de tiempo. En algunas realizaciones, al menos una subsecuencia predeterminada (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más subsecuencias predeterminadas) en la misma ubicación correspondiente dentro de el marcador de ácido nucleico de cada reactivo de detección puede detectarse o decodificarse en cada punto de tiempo o etapa de detección de una serie de tiempo. El período de tiempo entre dos puntos de tiempo cualesquiera o etapas de detección puede ser de cualquier duración, por ejemplo, segundos, minutos y horas. Por ejemplo, el período de tiempo entre dos puntos de tiempo cualquiera o etapas de detección puede variar desde aproximadamente 5 segundos hasta aproximadamente 2 horas, desde aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 1 hora, desde aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 30 minutos, o desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 15 minutos. En algunas realizaciones, el período de tiempo entre dos puntos de tiempo cualesquiera o etapas de detección puede ser inferior a 5 segundos. En otras realizaciones, el período de tiempo entre dos puntos de tiempo cualesquiera o etapas de detección puede ser superior a 2 horas, superior a 4 horas, superior a 6 horas, superior a 12 horas, superior a 1 día. Por ejemplo, una muestra que contiene los reactivos de detección se puede mantener a temperatura ambiente, a temperatura de nevera (por ejemplo, entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C) o a temperaturas bajo cero (por ejemplo, entre -80 °C o menos y 0 °C) durante el período de tiempo entre etapas de detección. En algunas realizaciones, cada etapa de detección subsiguiente se realiza sustancialmente inmediatamente uno tras otra (por ejemplo, en menos de 2 segundos, menos de 1 segundo).

En algunas realizaciones, las subsecuencias predeterminadas pueden detectarse en cualquier orden temporal. En algunas realizaciones, la siguiente subsecuencia predeterminada a detectar después de la anterior puede ubicarse más cerca de la anterior. En algunas realizaciones, la siguiente subsecuencia predeterminada a detectar después de la anterior puede ubicarse en al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más subsecuencias predeterminadas aparte de la anterior. En tales realizaciones, cualquier subsecuencia predeterminada que se haya pasado por alto en una etapa de detección anterior puede detectarse posteriormente. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, se puede usar un software implementado por ordenador para facilitar un análisis de las lecturas temporales de las etapas de detección, por ejemplo, reorganizar las lecturas temporales en un orden que corresponda a sus ubicaciones espaciales dentro de el marcador de ácido nucleico antes de realizar más análisis de comparación y cuantificación.

En algunas realizaciones, la detección o decodificación de las subsecuencias predeterminadas puede comprender la secuenciación de ácidos nucleicos. Los métodos para secuenciar ácidos nucleicos están bien establecidos para un experto en la materia, p. ej., pero sin limitarse a, ligación, hibridación, síntesis, amplificación o extensión de base única, o cualquier combinación de los mismos. Sólo a modo de ejemplo, como se muestra en Figura 1 o Figura 2, cada uno de los marcadores de ácido nucleico contiene tres subsecuencias predeterminadas (cada una de un nucleótido) conjugadas entre sí mediante un enlace directo tal como un enlace fosfodiéster. Cada etapa de secuenciación decodifica o determina un nucleótido, en el que cada nucleobase (A, G, C o T) genera una firma de señal distinta correspondiente a la nucleobase. En consecuencia, un orden temporal o serie temporal de las firmas de señal generadas a partir de cada etapa de secuenciación corresponde al reactivo de sonda respectivo y, por lo tanto, identifica el analito objetivo. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, en esta realización, el número de etapas de secuenciación realizados no es necesariamente igual al número de secuencias predeterminadas. En algunas realizaciones, el número de etapas de secuenciación realizadas puede ser menor que el número de secuencias predeterminadas. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 1, dos etapas de secuenciación podrían ser suficientes para identificar los tres reactivos de sonda diferentes, donde cada base está asociada con un color diferente. Sin embargo, la información adicional sobre ácidos nucleicos puede aumentar la precisión de la identificación de diferentes reactivos de sonda. Además, si la secuenciación de cada base puede producir uno de 4 colores, las subsecuencias de n bases (por ejemplo, las subsecuencias de 3 bases que se muestran en Figura 1 o Figura 2) puede producir 4ⁿ posibles lecturas únicas, es decir, 4ⁿ posibles reactivos de sonda distintos pueden distinguirse utilizando tales reactivos de detección descritos en este documento.

Si bien los métodos de secuenciación pueden transmitir una diferencia de base única, también se pueden usar otros métodos de detección o decodificación que transmiten información por la presencia o ausencia de "sitios" de hibridación completos o subsecuencias predeterminadas en el marcador de ácido nucleico para los métodos descritos

en el presente documento. En algunas realizaciones, la etapa de detección puede comprender la hibridación de una sonda decodificadora con una subsecuencia en el marcador de ácido nucleico del reactivo de detección, en la que la sonda decodificadora puede comprender un marcador detectable. En realizaciones particulares, el método de detección puede comprender: (a) hibridar un conjunto de sondas decodificadoras con una subsecuencia de los reactivos de detección, en el que cada subpoblación de las sondas decodificadoras puede comprender un marcador detectable, produciendo cada marcador detectable una firma de señal; (b) detectar dicha firma de señal producida por la hibridación de dicho conjunto de sondas decodificadoras; y (d) repetir las etapas (a) y (b) para otras subsecuencias de dichos reactivos de detección.

En algunas realizaciones, cada subpoblación de las sondas decodificadoras puede comprender un marcador detectable diferente, produciendo cada marcador detectable diferente una firma de señal diferente. En estas realizaciones, se pueden detectar las diferentes firmas de señales producidas por la hibridación del conjunto de sondas decodificadoras.

En algunas realizaciones, cada subpoblación de sondas decodificadoras puede ser complementaria (por ejemplo, parcialmente complementaria o completamente complementaria) a la subsecuencia de los reactivos de detección. En algunas realizaciones, una primera subpoblación y una segunda subpoblación de las sondas decodificadoras pueden ser complementarias (por ejemplo, parcialmente complementarias o completamente complementarias) a distintas subsecuencias de los reactivos de detección. En algunas realizaciones, al menos dos o más subpoblaciones de sondas decodificadoras pueden unirse a la misma subsecuencia de reactivos de detección. Por ejemplo, una primera subpoblación y una segunda subpoblación de sondas decodificadoras pueden ser complementarias (por ejemplo, parcialmente complementarias o completamente complementarias) a la misma subsecuencia de reactivos de detección.

Solo a modo de ejemplo, la Fig. 5 muestra un ejemplo de reactivo de detección que comprende reactivos de sonda anti-*C. albicans* y marcadores de ácido nucleico que contienen tres sitios de hibridación o subsecuencias predeterminadas conjugadas entre sí mediante enlazadores de secuencia. En la primera etapa de hibridación, un primer conjunto de sondas decodificadoras, cada una de las cuales comprende un marcador detectable distinto (p. ej., sondas de lectura de ADN complementarias que se muestran en la Figura 5, comprendiendo cada una un marcador óptico distinto) se hibrida con una primera subsecuencia predeterminada (por ejemplo, Sitio 1 en la Figura 5), seguido de la detección de una primera firma de señal producida por la hibridación. En la segunda etapa de hibridación, un segundo conjunto de sondas decodificadoras, cada una de las cuales comprende un marcador detectable distinto, se hibrida con una segunda subsecuencia predeterminada (p. ej., Sitio 2 en la Figura 5), seguido de la detección de una segunda firma de señal producida por la hibridación. La segunda subsecuencia predeterminada puede ser igual o diferente de la primera subsecuencia predeterminada. Sin embargo, en realizaciones preferidas, la segunda subsecuencia predeterminada es diferente de la primera subsecuencia predeterminada, por ejemplo, para minimizar la hibridación cruzada entre ellas. En consecuencia, las etapas de hibridación y detección de señales se repiten para otras subsecuencias de los reactivos de detección con un conjunto diferente de sondas decodificadoras, produciendo así un orden temporal o una serie temporal de las firmas de señal correspondientes al respectivo reactivo de sonda (y reactivo de detección).

Como se usa en el presente documento, el término "sonda decodificadora" se refiere a un oligonucleótido con una secuencia complementaria a una secuencia predeterminada del marcador de ácido nucleico. Por "complementario" se entiende que un ácido nucleico puede formar un enlace o enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico mediante tipos tradicionales u otros no tradicionales de Watson-Crick. La secuencia de la sonda decodificadora puede ser completa o parcialmente complementaria a una secuencia predeterminada. En algunas realizaciones, la complementariedad parcial se indica mediante el porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (p. ej., emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico (p. ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 siendo 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % complementarias). "Completamente complementaria" o 100% de complementariedad significa que todos los residuos contiguos de una secuencia de ácido nucleico formarán enlaces de hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda secuencia de ácido nucleico. La complementariedad menos que perfecta se refiere a la situación en la que algunas, pero no todas, las unidades de nucleósidos de dos hebras pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí.

La sonda decodificadora puede tener una secuencia de cualquier longitud. En algunas realizaciones, la sonda decodificadora puede tener una longitud de secuencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nucleótidos, o aproximadamente 5 a aproximadamente 20 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la sonda decodificadora puede comprender al menos un marcador detectable descrito en este documento. En algunas realizaciones, el marcador detectable puede ser un marcador óptico seleccionado del grupo que consiste en un colorante de molécula pequeña, una molécula o proteína fluorescente, un punto cuántico, un reactivo colorimétrico, una molécula o proteína cromogénica, un marcador Raman y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador detectable o marcador óptico puede ser una molécula o proteína fluorescente.

En algunas realizaciones, la sonda decodificadora puede modificarse, por ejemplo, modificación de la base o activarse con un grupo funcional para enlazarse a un marcador detectable.

El número de sondas decodificadoras en cada conjunto puede variar, dependiendo del número de subsecuencias distintas en cada hibridación. En algunas realizaciones, puede haber aproximadamente 1 a aproximadamente 100 sondas decodificadoras, aproximadamente 2 a aproximadamente 50 sondas decodificadoras, aproximadamente 4 a aproximadamente 20 sondas decodificadoras en cada conjunto. En algunas realizaciones, puede haber aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más sondas decodificadoras en cada conjunto. En algunas realizaciones, mientras que cada sitio de subsecuencia puede hibridar con un gran número de sondas decodificadoras, cada conjunto de sondas decodificadoras añadido en cada etapa de lectura para hibridar con el sitio de la subsecuencia dentro de los reactivos de detección puede generalmente tener tantas como colores fluorescentes disponibles. Por ejemplo, cada conjunto de sondas decodificadoras agregadas en cada etapa de lectura para hibridarse con el sitio de la subsecuencia de los reactivos de detección puede contener aproximadamente 3-4 sondas decodificadoras, cada una de las cuales está marcada con un color fluorescente distinto. En el caso de usar puntos cuánticos o marcadores Raman como marcadores de detección, puede haber más de 3 - 4 sondas decodificadoras en cada conjunto agregadas durante cada etapa de lectura.

Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, en el presente documento se muestra un ejemplo de "marcadores de ácido nucleico no superpuestos" o "marcadores SeqTag no superpuestos" (es decir, dos sondas decodificadoras no se hibridarán con el mismo sitio espacial del marcador de ácido nucleico) con fines ilustrativos. Suponiendo que hay 12 subsecuencias predeterminadas (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico) diseñadas para una hibridación cruzada mínima entre sí y con los complementos de los demás (por ejemplo, A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3 y C4). Considérese un reactivo de detección que comprende un marcador de ácido nucleico de la forma:

5' -----A[1-4]----B[1-4]----C[1-4]---- 3'

donde cada posición (p. ej., A[1-4]) contiene solo una de las subsecuencias (p. ej., A2)). Ahora, esta subsecuencia se decodifica o detecta usando sondas decodificadoras o sondas complementarias A1* - A4* cada una marcada en uno de los cuatro colores fluorescentes. Después de la lectura, la señal producida por el fluoróforo se puede eliminar (p. ej., desnaturar para deshacer la hibridación (y, por lo tanto, eliminar el fluoróforo)) antes de continuar con B1* - B4*. Dado que cada etapa produce uno de los cuatro resultados, este esquema de codificación puede proporcionar $4 \times 4 \times 4 = 64$ lecturas únicas. Estas sondas basadas en hibridación se pueden usar para marcar 64 reactivos de sonda diferentes que se pueden leer en tres ciclos.

En el caso de que dos sondas decodificadoras puedan superponerse, se puede usar un único sitio (p. ej., A en la forma de marcador de ácido nucleico anterior), que puede aceptar una de las diferentes sondas decodificadoras. Este sitio único se puede leer sometiéndolo a las diferentes sondas decodificadoras, por ejemplo, en conjuntos de 4 usando la forma de marcador de ácido nucleico como se muestra más arriba. Cuando se alcanza el conjunto correcto, el marcador de ácido nucleico, por ejemplo, el marcador SeqTag, debe ser oscuro (sin color). Este ejemplo no se interpreta como limitativo.

La ventaja de la lectura por hibridación es que puede ser rápida: la hibridación puede tener lugar en minutos o menos. Además, no se requieren productos químicos ni enzimas durante el proceso de lectura, ya que el proceso de lectura se puede realizar mediante métodos similares a los utilizados en la secuenciación de ácidos nucleicos, microscopía, espectroscopía o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, el método de lectura basado en hibridación puede reducir costes, reducir el almacenamiento de reactivos y/o simplificar el proceso.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, no puede haber límite en el movimiento espacial de un analito en una muestra durante una detección temporal de los reactivos de detección, por ejemplo, siempre que el analito permanezca dentro del campo de detección y haya al menos una misma característica distinguible en cada imagen tomada durante una detección temporal para que las imágenes puedan alinearse entre sí en función de la misma característica distinguible. En algunas realizaciones donde no existe tal característica distinguible, el movimiento espacial de un analito en una muestra puede ser inferior a 100 μm , incluyendo menos de 50 μm , menos de 25 μm , menos de 10 μm , menos de 1 μm o menor, durante un período de tiempo, durante el cual se produce una detección temporal de los reactivos de detección. En algunas realizaciones, el movimiento espacial de un analito en una muestra puede ser inferior a 1,000 nm, incluyendo menos de 500 nm, menos de 250 nm, menos de 100 nm, menos de 50 nm, menos de 10 nm o menos, durante un período de tiempo durante el cual se produce una detección temporal de los reactivos de detección. Más importante aún, el límite de movimiento espacial de un analito en una muestra durante una detección temporal está determinado por la capacidad de hacer coincidir las características distinguibles entre las imágenes tomadas durante una detección temporal, que puede verse afectada por las condiciones de formación de imágenes. En algunas realizaciones, el analito se puede fijar sobre un sustrato o soporte sólido. En algunas realizaciones donde hay o se espera que haya un movimiento espacial de un analito durante la detección temporal, se puede determinar y registrar la ubicación del analito con respecto a una muestra durante cada etapa de detección. Dicho desplazamiento espacial puede corregirse posteriormente durante el análisis de la señal utilizando cualquier algoritmo implementado por ordenador reconocido en la técnica.

El tiempo necesario para realizar una detección temporal de los reactivos de detección (p. ej., el tiempo necesario para obtener una secuencia temporal de firmas de señales para los reactivos de detección) puede variar, dependiendo del número de subsecuencias predeterminadas que se detectarán o leerán y/o el número de señales de detección disponibles (p. ej., color fluorescente y/o campo claro) que se leerán. En algunas realizaciones, el tiempo requerido para realizar una detección temporal de los reactivos de detección puede ser, por ejemplo, pero no limitado a, 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas o más.

Los reactivos de detección pueden detectarse por cualquier medio disponible en la técnica que sea capaz de detectar las señales específicas en un reactivo de detección dado generado durante los métodos basados en secuenciación o hibridación. Cuando los reactivos de detección (por ejemplo, hibridados con sondas decodificadoras) están marcados con fluorescencia, se puede determinar fácilmente la consideración adecuada de las fuentes de excitación apropiadas. Las posibles fuentes pueden incluir, pero sin limitarse a, lámpara de arco, lámpara de xenón, láseres, diodos emisores de luz o alguna combinación de los mismos. La fuente de excitación apropiada se usa junto con un sistema de detección óptica apropiado, por ejemplo, un microscopio fluorescente invertido, un microscopio epifluorescente o un microscopio confocal. Preferiblemente, se usa un microscopio que pueda permitir la detección con suficiente resolución espacial para separar distintas señales de los reactivos de detección individuales.

Los ejemplos de métodos para la detección de los reactivos de detección que son aplicables a los métodos descritos en este documento incluyen, sin limitaciones, los métodos descritos en la patente de los Estados Unidos No. 7,473,767, la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2007/0166708y la solicitud de patente de los Estados Unidos No. US 2010/0261026.

Los métodos adicionales que se pueden usar para detectar firmas ópticas incluyen, pero sin limitarse a, cualquier técnica espectroscópica, citometría de flujo o cualquier método reconocido en la técnica que involucre un escáner óptico y/o un fotodetector (p. ej., sin limitaciones, dispositivos de carga acoplada, sensores de píxeles activos, sensores de luz de fotodiodo (p. ej., LED), detectores ópticos y cualquier combinación de los mismos). Los ejemplos no limitativos de técnicas espectroscópicas pueden incluir espectroscopia de absorción, espectroscopia de emisión, espectroscopia de dispersión elástica, espectroscopia de reflexión, espectroscopia de impedancia, espectroscopia inelástica, espectroscopia coherente o de resonancia, espectroscopia de fluorescencia de plasmón superficial, espectroscopia Raman y cualquier combinación de las mismas. Las técnicas de espectroscopia se pueden usar para detectar luz de cualquier longitud de onda, incluidas, pero sin limitarse a, microondas, terahercios, infrarrojo, infrarrojo cercano, visible, ultravioleta, rayos X, gamma y cualquier combinación de los mismos.

Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, en algunas realizaciones, al menos una subsecuencia predeterminada (p. ej., bases individuales o regiones de hibridación) puede corresponder a ninguna firma óptica; es decir, la ausencia de color se puede considerar como un color adicional. En otras realizaciones, al menos una subsecuencia predeterminada (por ejemplo, bases individuales o regiones de hibridación) puede corresponder a una firma óptica compuesta, por ejemplo, dos o más fluorescencias simultáneas en múltiples canales durante la detección (por ejemplo, por microscopía).

Si bien una sola área de una muestra puede interactuar con más de un reactivo de sonda, el marcador de ácido nucleico puede diseñarse de tal manera que cualquier superposición conocida o potencial pueda separarse de la salida de la señal. En el caso de que una sonda pueda solaparse potencialmente con todas las demás, se puede utilizar la variación de lectura por hibridación y asignar a cada sonda una sola secuencia de hibridación única. Tal enfoque puede evitar múltiples incubaciones largas de la sonda y etapas de extracción dañinas.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, las firmas de señal producidas durante cualquier etapa de lectura (p. ej., basada en secuenciación o basada en hibridación) deben eliminarse antes de avanzar a la siguiente subsecuencia predeterminada de los reactivos de detección. La eliminación de las firmas de señal se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluidos, pero sin limitarse a, lavado, calentamiento, fotoblanqueo, desplazamiento, escisión, digestión enzimática, inactivación, degradación química, blanqueo, oxidación y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las sondas decodificadoras se pueden diseñar de manera que se puedan lavar simplemente con un tampón simple o se pueden modificar variando las concentraciones de sal o usando detergentes o desnaturalizantes como formamida o dimetilsulfóxido (DMSO).

En otras realizaciones, la firma de color o fluorescencia de un etapa de lectura puede atenuarse o eliminarse fotoblanqueando la señal utilizando una exposición óptica suficiente. En realizaciones alternativas, la firma de color o fluorescencia de un etapa de lectura puede atenuarse o eliminarse sometiendo la firma de color o fluorescencia a degradación química en condiciones apropiadas, por ejemplo, utilizando un agente reductor o una solución oxidante como peróxido de sodio 0.01 M.

En algunas realizaciones, las sondas decodificadoras se pueden desplazar de sus sitios de hibridación introduciendo otros reactivos o desplazadores de sonda que tienen afinidades de unión más fuertes a esos mismos sitios. Esto se puede hacer, por ejemplo, usando secuencias de ácido nucleico que son más largas y/o tienen mejor

complementariedad que las secuencias de la sonda decodificadora. Por ejemplo, para crear una "mejor complementariedad" de los desplazadores de la sonda, en algunas realizaciones, se pueden sembrar desajustes en la región de hibridación. En otras realizaciones, la región de hibridación puede estar precedida y/o seguir con un "apoyo" de aproximadamente 3-8 bases (por ejemplo, 6 bases). En tales realizaciones, la "mejor complementariedad" del desplazador de la sonda puede estar fuera de la región de hibridación, lo que puede facilitar el diseño de las regiones de hibridación.

En algunas realizaciones, las enzimas se pueden usar para desplazar, digerir, cortar y/o escindir los marcadores detectables, la secuencia de la sonda decodificadora, el complejo hibridado (formado por la sonda decodificadora y la subsecuencia predeterminada) y/o el enlazador de secuencia escindible al complejo hibridado, para eliminar las firmas de señal. Un ejemplo es introducir una desoxiuridina en la sonda decodificadora. Esta base modificada se puede escindir usando la mezcla de enzimas conocida como USER, cortando así la secuencia de la sonda decodificadora en dos partes. Dado que cada parte es ahora más corta, se caracteriza por una temperatura de fusión más baja y puede fundir los sitios de hibridación de los reactivos de detección. Alternativamente, un experto en la técnica puede emplear una de las numerosas nucleasas o enzimas de restricción específicas de secuencia reconocidas en la técnica, que pueden cortar la secuencia de la sonda decodificadora, la subsecuencia predeterminada que se ha hibridado con las sondas decodificadoras, el enlazador de secuencia escindible unido a la subsecuencia hibridada y/o el complejo hibridado de la misma, eliminando así la firma de señal.

En algunas realizaciones, se puede usar la desnaturalización térmica para eliminar la firma de señal de una lectura anterior. En algunas realizaciones en las que está involucrada la secuenciación, la desnaturalización térmica puede reducirse o evitarse utilizando un enfoque de secuenciación por ligadura y estableciendo la base del marcador de ácido nucleico que sigue inmediatamente al cebador de secuenciación (en la dirección de la ligadura) a una adenina. En consecuencia, las sondas de ligadura deben incluir un (desoxi-)uracilo en la posición proximal del cebador. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, una enzima como USER, que escinde el ADN en los uracilos, se puede usar para eliminar la sonda de ligadura y preparar el sistema para la siguiente etapa de secuenciación. Estos fragmentos tendrán temperaturas de fusión más bajas que sus sondas principales, y estas temperaturas pueden diseñarse para que caigan por debajo de la temperatura de funcionamiento (o requieran una temperatura de desnaturalización aceptable).

Después de que la detección de las subsecuencias predeterminadas se completa de manera secuencial en el tiempo, en algunas realizaciones, el método descrito en el presente documento puede comprender además comparar el orden temporal de las firmas de señal con diferentes identificadores de dicho al menos un reactivo de sonda, en el que un acuerdo entre el orden temporal de las firmas de señal y un identificador particular de dicho al menos un reactivo de sonda identifica el analito en la muestra. En algunas realizaciones, el método puede comprender además medir la intensidad de las firmas de señal generadas a partir de cada subpoblación de reactivos de detección. En algunas realizaciones, la intensidad de las firmas de señal generadas a partir de cada subpoblación de reactivos de detección puede indicar una cantidad del analito. En algunas realizaciones, la intensidad relativa de las firmas de señal se puede usar en la identificación de cada subpoblación de reactivos de detección. Por lo tanto, la intensidad de las firmas de señal se puede usar como parte de un esquema de codificación de los reactivos de detección descritos en este documento. Las etapas de comparación y medición de intensidad se pueden realizar, por ejemplo, mediante un software o algoritmo implementado por ordenador.

Los tipos de firma o firmas de señal pueden variar de acuerdo con las diferentes realizaciones de los reactivos de detección y/o las sondas decodificadoras descritas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "firma de señal" se refiere a un cambio en una respuesta o indicador que es detectable por observación o instrumentalmente. En ciertos casos, la firma de señal es fluorescencia o un cambio en la fluorescencia, por ejemplo, un cambio en la intensidad de fluorescencia, excitación de fluorescencia o distribución de la longitud de onda de emisión, tiempo de vida de la fluorescencia y/o polarización de la fluorescencia. Solo a modo de ejemplo, la fluorescencia se puede producir uniendo un fluoróforo a una sonda decodificadora y/o detectando la hibridación usando un tinte fluorescente, por ejemplo, SYBR Gold, que se enciende cuando la secuencia de ácido nucleico se vuelve de cadena doble. En algunos otros casos, la firma de señal puede ser radiactividad (es decir, radiación), incluidas partículas alfa, partículas beta, nucleones, electrones, positrones, neutrinos y rayos gamma emitidos por una sustancia radiactiva tal como un radionúclido. A modo de ejemplo, los reactivos de detección y/o las sondas decodificadoras pueden comprender una molécula o marcador óptico, produciendo así firmas ópticas. Los ejemplos de firmas ópticas pueden incluir, sin limitaciones, firmas de color fluorescente, luz visible, sin color y cualquier combinación de las mismas. En tales realizaciones, las firmas ópticas pueden detectarse mediante formación de imágenes ópticas o espectroscopia.

Reactivos de detección (o moléculas de detección como se usan indistintamente en este documento)

También se describe en este documento un reactivo de detección, que puede usarse, por ejemplo, en los métodos descritos en este documento para cualquier ensayo de multiplexación. El reactivo de detección comprende al menos un reactivo de sonda y al menos un marcador de ácido nucleico, en el que dicho al menos un marcador de ácido nucleico comprende al menos una subsecuencia predeterminada para ser detectada de manera secuencial en el tiempo; en el que dicha al menos una subsecuencia predeterminada forma un identificador de dicho al menos un

reactivo de sonda; y en el que dicho al menos un reactivo de sonda y dicho al menos un marcador de ácido nucleico se conjugan entre sí.

Los reactivos de detección descritos en este documento pueden existir en diferentes formas. Solo a modo de ejemplo, en algunas realizaciones, el reactivo de detección puede ser una molécula de detección. En algunas realizaciones, el reactivo de detección puede ser una partícula de detección. En algunas realizaciones, el reactivo de detección puede ser multimolecular.

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a dos moléculas que se unen entre sí, por ejemplo, uniendo un reactivo de sonda a un marcador de ácido nucleico. El proceso de conjugación se puede realizar, por ejemplo, mediante una reacción química o mediante un enlazador, que se describirá más adelante.

Dependiendo de varias aplicaciones y/o condiciones de ensayo (p. ej., sensibilidad, volumen/concentración de la muestra), se puede amplificar una señal de lectura de un reactivo de detección aumentando el número de marcadores de ácido nucleico presentes en el reactivo de detección, por ejemplo, conjugando al menos un reactivo de sonda con una pluralidad de marcadores de ácido nucleico. En tales realizaciones, una pluralidad de marcadores de ácido nucleico presentes en el reactivo de detección puede oscilar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100,000, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10,000, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 1,000 o entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100. En algunas realizaciones en las que el reactivo de detección comprende una partícula como centro, el número de posibles marcadores de ácido nucleico presentes en el reactivo de detección puede depender del tamaño de una partícula. Generalmente, cuanto más grande es la partícula, más marcadores de ácido nucleico se pueden incorporar en el reactivo de detección. Por ejemplo, una partícula de aproximadamente 1-2 μm de tamaño puede permitir la incorporación de aproximadamente 100,000 marcadores de ácido nucleico en el reactivo de detección. En algunas realizaciones, puede haber 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000 marcadores de ácido nucleico presentes en el reactivo de detección. Un experto en la técnica puede determinar el número óptimo de marcadores de ácido nucleico presentes en el reactivo de detección sin ninguna experimentación innecesaria.

Los reactivos de detección descritos en el presente documento se pueden utilizar en cualquier ensayo biológico para la detección, identificación y/o cuantificación de moléculas o analitos objetivo, incluido el recuento de células marcadas, tales como células bacterias o cancerosas, en una muestra. Solo a modo de ejemplo, en algunas realizaciones, el reactivo de detección se puede adaptar para su uso en inmunofluorescencia. En realizaciones alternativas, el reactivo de detección se puede adaptar para su uso en inmunohistoquímica. En otras realizaciones, el reactivo de detección se puede adaptar para su uso en hibridación *in situ* con fluorescencia. En algunas realizaciones, el reactivo de detección se puede adaptar para su uso en transferencia Western. Dependiendo de la naturaleza de la muestra y/o aplicaciones, el reactivo de detección puede adaptarse para estar en cualquier formato, por ejemplo, inmovilizado en un soporte sólido, o en una fase de solución o suspensión. En ciertas realizaciones, el reactivo de detección se puede adaptar para estar presente en una fase de solución o suspensión. La frase "en una fase de solución o suspensión", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a suspender los reactivos de detección en un fluido líquido, por ejemplo, una solución tampón acuosa. Se discutirán aplicaciones adicionales de los reactivos de detección y/o métodos descritos en este documento.

Reactivos de sonda (o moléculas de sonda como se usan indistintamente en este documento)

Cada uno de los reactivos de detección descritos en el presente documento puede comprender cualquier número de reactivos de sonda. En algunas realizaciones, el reactivo de detección puede comprender uno o más reactivos de sonda, por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más reactivos de sonda. En una realización, el reactivo de detección puede comprender un reactivo de sonda. En otras realizaciones, el reactivo de detección puede comprender una pluralidad de reactivos de sonda, por ejemplo, que van desde aproximadamente 2 a aproximadamente 100,000 reactivos de sonda, aproximadamente 2 a aproximadamente 10,000 reactivos de sonda, aproximadamente 2 a aproximadamente 1,000 reactivos de sonda, o aproximadamente 2 a aproximadamente 100 reactivos de sonda. En algunas realizaciones en las que el reactivo de detección comprende una partícula como concentrador, el número de posibles reactivos de sonda presentes en el reactivo de detección puede depender del tamaño de una partícula. Generalmente, cuanto más grande es la partícula, más reactivos de sonda se pueden incorporar al reactivo de detección. Por ejemplo, una partícula de aproximadamente 1-2 μm de tamaño puede permitir la incorporación de aproximadamente 100,000 reactivos de sonda en el reactivo de detección. En algunas realizaciones, puede haber aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000 reactivos de sonda presentes en el reactivo de detección. Un experto en la técnica puede determinar el número óptimo de reactivos de sonda presentes en el reactivo de detección sin ninguna experimentación innecesaria.

Como se usa indistintamente en el presente documento, el término "sonda", "reactivo de sonda" o "molécula de sonda" se refiere a una entidad (p. ej., pero sin limitarse a, una molécula, una partícula, una entidad compuesta o una entidad multimolecular) que interactúa o se une a una molécula objetivo o un analito para el análisis del objetivo o el analito. Normalmente, la naturaleza de la interacción o unión es no covalente, por ejemplo, por interacciones de hidrógeno, electrostáticas o de van der Waals; sin embargo, la unión también puede ser covalente. Los reactivos de sonda pueden ser entidades (p. ej., pero sin limitarse a, moléculas, partículas, entidades compuestas o entidades multimoleculares)

capaces de experimentar eventos de unión o reconocimiento molecular con moléculas objetivo. Los reactivos de sonda pueden ser naturales, recombinantes o sintéticos. Los ejemplos del reactivo de sonda pueden incluir, pero sin limitarse a, un ácido nucleico, un anticuerpo o una porción del mismo, una molécula similar a un anticuerpo, una enzima, una célula, un antígeno, una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un peptidomimético, un aptámero y cualquier combinación de los mismos. Solo a modo de ejemplo, en inmunohistoquímica, el reactivo de sonda puede incluir un anticuerpo específico para el antígeno objetivo que se va a analizar. Un experto en la materia puede identificar fácilmente los reactivos de sonda apropiados para las moléculas objetivo o los analitos de interés que se van a detectar en varios bioensayos. En algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser multimolecular. Por ejemplo, en una realización, el reactivo de sonda puede comprender una partícula, un anticuerpo, biotina y/o estreptavidina, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los reactivos de sonda se pueden modificar por cualquier medio conocido por un experto en la materia. Los métodos para modificar cada tipo de reactivo de sonda están bien reconocidos en la técnica. Dependiendo de los tipos de reactivos de sonda, un ejemplo de modificación incluye, pero sin limitarse a, modificación genética, biotinilación, marcaje (con fines de detección), modificación química (p. ej., para producir derivados o fragmentos del reactivo de sonda) y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el reactivo de sonda se puede modificar genéticamente. En algunas realizaciones, el reactivo de sonda se puede biotinilar.

Como se usa en el presente documento, los términos "proteínas" y "péptidos" se usan indistintamente en el presente documento para designar una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de residuos adyacentes. Los términos "proteína" y "péptido", que se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un polímero de aminoácidos proteicos, incluidos los aminoácidos modificados (p. ej., fosforilados, glicosilados, etc.) y análogos de aminoácidos, independientemente de su tamaño o función. Aunque "proteína" se usa a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y "péptido" se usa a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se superpone y varía. El término "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a péptidos, polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteínas, a menos que se indique lo contrario. Los términos "proteína" y "péptido" se usan indistintamente en el presente documento cuando se refieren a un producto génico y fragmentos del mismo. Por lo tanto, los ejemplos de péptidos o proteínas incluyen productos génicos, proteínas de origen natural, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes, fragmentos y análogos de los anteriores.

Como se usa en este documento, el término "peptidomimético" se refiere a una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural.

El término "ácidos nucleicos" utilizado en el presente documento se refiere a polímeros (polinucleótidos) u oligómeros (oligonucleótidos) de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consisten en bases naturales, azúcares y enlaces entre azúcares. El término "ácido nucleico" también incluye polímeros u oligómeros que comprenden monómeros no naturales, o porciones de los mismos, que funcionan de manera similar. Ejemplos de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla o doble. El ácido nucleico bloqueado (LNA), a menudo denominado ARN inaccesible, es un nucleótido de ARN modificado. La fracción de ribosa de un nucleótido de LNA se modifica con un puente adicional que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. El puente "bloquea" la ribosa en la conformación 3'-endo. Los nucleótidos de LNA se pueden mezclar con residuos de ADN o ARN en el oligonucleótido siempre que se desee. Dichos oligómeros de LNA generalmente se sintetizan químicamente. El ácido nucleico peptídico (PNA) es un polímero sintetizado artificialmente similar al ADN o al ARN. El ADN y el ARN tienen una cadena de azúcar desoxirribosa y ribosa, respectivamente, mientras que la cadena del PNA está compuesta por unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. El PNA generalmente se sintetiza químicamente. A menos que se limite específicamente, el término "ácidos nucleicos" abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (p. ej., sustituciones de codones degeneradas) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985), y Rossolini, et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). También debe entenderse que el término "ácido nucleico" incluye, como equivalentes, derivados, variantes y análogos de ARN o ADN elaborados a partir de análogos de nucleótidos, y polinucleótidos de cadena sencilla (sentido o antisentido) y de cadena doble.

En algunas realizaciones, el término "ácido nucleico" descrito en el presente documento puede incluir un ácido nucleico modificado. Los ácidos nucleicos modificados son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, un ácido nucleico descrito en el presente documento puede comprender una o más modificaciones de ácido nucleico conocidas en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una o más modificaciones de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en modificaciones de enlaces entre nucleótidos (modificaciones de enlaces entre azúcares), modificaciones de azúcares, modificaciones de nucleobases, modificaciones/reemplazos de la cadena principal y cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de modificaciones de enlaces internucleotídicos incluyen, pero no se

limitan a, fosforotioato, fosforoditioato, fosfotriéster (p. ej., fosfotriéster de alquilo), aminoalquilfosfotriéster, fosfonato de alquilo (p. ej., fosfonato de metilo), selenofosfato, fosforamidato (p. ej., N-alquilfosforamidato), boranofosfonato y similares. Ejemplos de modificaciones de azúcar incluyen, pero no se limitan a, 2'-O-Me (2'-O-metilo), 2'-O-MOE (2'-O-metoxietilo), 2'-F, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA), 2'-S-metilo, 2'-O-CH₂-(4'-C) (LNA), 2'-O-CH₂CH₂-(4'-C) (ENA), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), azúcar arabinosa y similares. Los ejemplos de modificaciones de nucleobases incluyen, pero no se limitan a, inosina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina, tubecidina, 5-metilcitosina (5-me-C); 5-hidroximetilcitosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 6-metilo y otros derivados 6-alquilo de adenina y guanina; 2-propilo y otros derivados 2-alquilo de adenina y guanina; 2-tiouracilo; 2-tiotimina; 2-tiocitosina; 5-propinil uracilo; 5-propinil citosina; 6-azouracilo; 6-azocitosina; 6-azotimina; 5-uracilo (pseudouracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8; 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5; 7-metilo y otros derivados 7-alquilo de adenina y guanina; 8-azaguanina; 8-azaadenina; 7-deazaguanina; 7-deazaadenina; 3-deazaguanina; 3-deazaadenina; base universal; y cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de modificaciones de la cadena principal incluyen, pero no se limitan a, morfolino, ciclobutilo, pirrolidina, ácido peptidónucleico (PNA), PNA de aminoetilglicilo (aegPNA), PNA de pirrolidina de cadena extendida (bepPNA), y similares.

El término "enzimas", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de proteína que cataliza reacciones químicas de otras sustancias sin que se destruya o altere sustancialmente al completar las reacciones. El término puede incluir enzimas naturales y enzimas obtenidas por bioingeniería o mezclas de las mismas. Los ejemplos de familias de enzimas incluyen quinasas, deshidrogenasas, oxidorreductasas, GTPasas, carboxiltransferasas, aciltransferasas, descarboxilasas, transaminasas, racemasas, metiltransferasas, formiltransferasas y α -cetodescarboxilasas.

Como se usa en el presente documento, el término "aptámeros" significa una secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, parcialmente de cadena sencilla, parcialmente de cadena doble o de cadena doble capaz de reconocer específicamente una molécula o grupo de moléculas no oligonucleotídica seleccionada. En algunas realizaciones, el aptámero reconoce la molécula no oligonucleotídica o el grupo de moléculas mediante un mecanismo distinto del emparejamiento de bases de Watson-Crick o la formación de triplex. Los aptámeros pueden incluir, sin limitación, segmentos de secuencia definidos y secuencias que comprenden nucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados y nucleótidos que comprenden modificaciones de la cadena principal, puntos de ramificación y residuos, grupos o puentes que no son de nucleótidos. Los métodos para seleccionar aptámeros para unirse a una molécula son ampliamente conocidos en la técnica y fácilmente accesibles para un experto en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" o "anticuerpos" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a un fragmento de unión a antígeno monoclonal o policlonal con la región Fc (fragmento cristizable) o fragmento de unión a FcRn de la región Fc. El término "anticuerpos" también incluye "moléculas similares a anticuerpos", tales como fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los "fragmentos de unión a antígeno" incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb y fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio único, anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir la unión específica del antígeno al polipéptido. Los anticuerpos lineales también se incluyen para los fines descritos en este documento. Los términos Fab, Fc, pFc', F(ab')₂ y Fv se emplean con significados inmunológicos estándar (Klein, Immunology (John Wiley, Nueva York, NY, 1982); Clark, WR (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology (Wiley & Sons, Inc., Nueva York); y Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7.^a edición, (Blackwell Scientific Publications, Oxford)). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos específicos para varios antígenos están disponibles comercialmente de proveedores tales como R&D Systems, BD Biosciences, e-Biosciences y Miltenyi, o pueden generarse contra estos marcadores de superficie celular mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión al antígeno. Cada dominio variable normalmente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de la complementariedad puede comprender residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" tal como la define Kabat (es decir, aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991)) y/o esos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, aproximadamente los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). En algunos casos, una región determinante de la complementariedad puede incluir aminoácidos tanto de una región CDR definida de acuerdo con Kabat como de un bucle hipervariable.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al. , Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

La expresión "fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla" o "scFv", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. (Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994)).

El término "diacuerpos", como se usa en este documento, se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. (EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., P0:6444-6448 (1993)).

Como se usa en el presente documento, el término "moléculas pequeñas" se refiere a moléculas naturales o sintéticas que incluyen, pero sin limitarse a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, aptámeros, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluidos compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10,000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5,000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1,000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

El término "células" utilizado en el presente documento se refiere a cualquier célula, procariota o eucariota, incluidas plantas, levaduras, gusanos, insectos y mamíferos. Las células de mamífero incluyen, sin limitación: primate, humano y una célula de cualquier animal de interés, incluidos, pero sin limitarse a: ratón, hámster, conejo, perro, gato, animales domésticos, tales como equino, bovino, murino, ovino, canino, felino, etc. Las células pueden ser una amplia variedad de tipos de tejido sin limitación tales como: células hematopoyéticas, neurales, mesenquimales, cutáneas, mucosas, estromales, musculares, del bazo, reticuloendoteliales, epiteliales, endoteliales, hepáticas, renales, gastrointestinales, pulmonares, células T, etc. También se pueden incluir células madre, células madre embrionarias (ES), células derivadas de ES y progenitores de células madre, incluyendo sin limitación, células madre hematopoyéticas, neurales, estromales, musculares, cardiovasculares, hepáticas, pulmonares, gastrointestinales, etc. También pueden usarse células de levadura como células en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las células pueden ser células *ex vivo* o cultivadas, p. ej., *in vitro*. Por ejemplo, para células *ex vivo*, las células se pueden obtener de un sujeto, cuando el sujeto está sano y/o afectado por una enfermedad. Las células se pueden obtener, a modo de ejemplo no limitativo, mediante biopsia u otros medios quirúrgicos conocidos por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, el término "antígenos" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y además capaz de usarse en un animal para provocar la producción de anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos. El término "antígeno" también puede referirse a una molécula capaz de unirse a un anticuerpo o a un receptor de células T (TCR) si se presenta mediante moléculas del MHC. El término "antígeno", como se usa en el presente documento, también abarca epítopos de células T. Un antígeno es además capaz de ser reconocido por el sistema inmunitario y/o ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T. Sin embargo, esto puede requerir que, al menos en ciertos casos, el antígeno contenga o esté unido a un epítipo de células Th y se administre como adyuvante. Un antígeno puede tener uno o más epítopos (epítopos B y T). La reacción específica a la que se hace referencia anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará preferentemente, típicamente de una manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo o TCR y no con la multitud de otros anticuerpos o TCR que pueden ser provocados por otros antígenos. Los antígenos, como se usan en este documento, también pueden ser mezclas de varios antígenos individuales.

En algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser un anticuerpo o una porción del mismo, o una molécula similar a un anticuerpo. En tales realizaciones, los reactivos de sonda se pueden usar para, por ejemplo, detectar y/o identificar especies o tipos de patógenos, la presencia de marcadores celulares o de enfermedades, niveles de expresión de proteínas celulares, fosforilación u otro estado de modificación posterior a la traducción, o cualquier combinación de los mismos. Sólo a modo de ejemplo, la Figura 1 muestra tres realizaciones diferentes de los reactivos de detección que comprenden al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) anticuerpos específicos de patógenos (p. ej., anti-*E. Coli*, anti-*S. aureus* y anti-*C. albicans*).

En algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser un ácido nucleico (p. ej., ADN, ARN, LNA, PNA o cualquier combinación de los mismos). En dichas realizaciones, los ácidos nucleicos se pueden usar para determinar, por ejemplo, la existencia de secuencias de ADN o ARN celulares características (tal como en la hibridación *in situ* fluorescente), los niveles de expresión de ARN, la presencia y expresión de miARN y cualquier combinación de los mismos, en diversas aplicaciones, por ejemplo, para la detección y/o identificación de patógenos.

En algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser una proteína o un péptido. En tales realizaciones, la proteína o el péptido puede ser esencialmente cualquier proteína con objetivos de unión conocidos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, proteínas inmunitarias innatas (por ejemplo, sin limitaciones, MBL, Dectina-1, TLR2 y TLR4) y proteínas que comprenden el dominio de unión a quitina. Tales proteínas inmunes innatas y proteínas de dominio de unión a quitina se pueden usar para detectar sus objetivos de reconocimiento de patrones correspondientes (por ejemplo, microbios tales como bacterias) y hongos, respectivamente. Solo a modo de ejemplo, en lugar de usar anticuerpos específicos de patógenos como reactivos de sonda en los reactivos de detección como se muestra en la Figura 1, Las proteínas inmunitarias innatas (p. ej., MBL) o las proteínas del dominio de unión a quitina se pueden utilizar como reactivos de sonda para la detección de patógenos. Si bien dichos reactivos de detección se pueden usar para detectar patógenos, es posible que no sean específicos de patógenos, en comparación con los que usan anticuerpos específicos de patógenos como moléculas de sonda.

En algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser un aptámero. En algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser un aptámero de ADN o ARN. Los aptámeros se pueden usar en varios bioensayos, por ejemplo, de la misma manera que los anticuerpos o ácidos nucleicos descritos en este documento. Sólo a modo de ejemplo, la Figura 2 muestra algunas ejemplos de realizaciones de los reactivos de detección que comprenden al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) aptámeros de ADN (p. ej., con una secuencia de nucleótidos complementaria a los factores de reprogramación nuclear, tales como Oct4, Sox2 y Klf4). Dichos reactivos de detección pueden usarse para determinar el nivel de expresión de ARN de factores de reprogramación nuclear en células somáticas para detectar, seleccionar o identificar células madre (p. ej., células madre de pluripotencia inducida).

En algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser un ligando del receptor de la superficie celular. Como se usa en el presente documento, un "ligando del receptor de la superficie celular" se refiere a una molécula que puede unirse a la superficie externa de una célula. Por ejemplo, el ligando de receptor de superficie celular incluye, por ejemplo, un péptido de unión a receptor de superficie celular, un glicopéptido de unión a receptor de superficie celular, una proteína de unión a receptor de superficie celular, una glicoproteína de unión a receptor de superficie celular, un compuesto orgánico de unión a receptor de superficie celular y un fármaco de unión a receptor de superficie celular. Los ligandos de receptores de superficie celular adicionales incluyen, pero no se limitan a, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos y factores angiogénicos.

Cuando los reactivos de detección descritos en el presente documento se usan como vehículos de administración dirigidos, por ejemplo, para un agente de diagnóstico, en algunas realizaciones, el reactivo de sonda puede ser un ligando endosomolítico. Como se usa en el presente documento, el término "ligando endosomolítico" se refiere a moléculas que tienen propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos pueden promover la lisis y/o el transporte de la composición descrita en el presente documento, o sus componentes, desde los compartimentos celulares como el endosoma, lisosoma, retículo endoplásmico (ER), aparato de Golgi, microtúbulos, peroxisomas u otros cuerpos vesiculares dentro de la célula, al citoplasma de la célula. Algunos ejemplos de ligandos endosomolíticos incluyen, pero sin limitarse a, imidazoles, poli u oligoimidazoles, polietileniminas (PEI) lineales o ramificadas, poliaminas lineales y ramificadas, p. ej., espermina, poliaminas catiónicas lineales y ramificadas, policarboxilatos, policationes, oligo o policationes o aniones enmascarados, acetales, poliacetales, cetales/policetales, ortoésteres, polímeros lineales o ramificados con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas, dendrímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas, péptidos polianiónicos, peptidomiméticos polianiónicos, péptidos sensibles al pH, lípidos fusogénicos naturales y sintéticos, lípidos catiónicos naturales y sintéticos.

En otras realizaciones, el reactivo de sonda para uso en la administración de un agente (p. ej., un agente de diagnóstico) encapsulado dentro de los reactivos de detección descritos en el presente documento puede ser un ligando modulador de PK. Como se usa en el presente documento, los términos "ligando modulador de PK" y "modulador de PK" se refieren a moléculas que pueden modular la farmacocinética de la composición descrita en el presente documento. Algunos ejemplos de moduladores de PK incluyen, pero sin limitarse a, moléculas lipófilas, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, vitaminas, ácidos grasos, fenoxazina, aspirina, naproxeno, ibuprofeno, suprofen, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, PEG, biotina y ligandos de unión a transtiretina (por ejemplo, ácido tetraiidotiroacético, ácido 2,4,6-triyodofenol y ácido flufenámico).

En diversas realizaciones, el reactivo de detección descrito en el presente documento puede comprender un tipo/especie de reactivos de sonda o diferentes tipos/especies de reactivos de sonda. En algunas realizaciones, el tipo/especie de los reactivos de sonda presentes en el reactivo de detección puede ser el mismo. En otras realizaciones, el reactivo de detección puede incluir al menos un tipo/especie diferente de los reactivos de sonda (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 especies de reactivos de sonda). En dichas realizaciones, las distintas especies de reactivos de sonda pueden ser diferentes de las demás por tipos (p. ej., anticuerpos frente a aptámeros de ADN), dominios de unión y/o analitos objetivo.

Etiquetas de ácido nucleico

De acuerdo con las realizaciones, el marcador de ácido nucleico o la etiqueta de ácido nucleico comprende al menos una subsecuencia de ácido nucleico predeterminada, que se usa para identificar un analito o un objetivo. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico o la etiqueta de ácido nucleico puede comprender cualquier número de subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas, por ejemplo, que van desde aproximadamente 1 a aproximadamente 100, desde aproximadamente 2 a aproximadamente 80, o desde aproximadamente 3 a aproximadamente 50. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico o la etiqueta de ácido nucleico puede comprender al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70 o más subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico o la etiqueta de ácido nucleico puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 o más subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, la cantidad mínima de subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas (n) requeridas en el reactivo de detección puede variar de acuerdo con la cantidad de sondas distintas que se detectarán (X) y/o la cantidad de marcadores detectables distintos (p. ej., marcadores ópticos tales como marcadores fluorescentes o puntos cuánticos) disponibles para usar (Y), y n se puede determinar mediante la ecuación:

$$n = \text{redondeo hacia arriba} \left(\frac{\ln X}{\ln Y} \right)$$
, donde la función matemática "redondeo hacia arriba" se refiere a redondear un número no entero al entero más cercano, cuando sea necesario. Por ejemplo, si se utilizan 4 marcadores (Y) detectables distintos para distinguir 62 reactivos (X) de sonda distintos, $n = \text{redondeo hacia arriba} (2.98) \sim 3$. Por lo tanto, en este ejemplo se requieren al menos tres subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas.

En algunas realizaciones donde los marcadores detectables no incluyen color (oscuro), el número de marcadores detectables distintos disponibles para usar puede convertirse en $Y+1$. En tales realizaciones, n puede determinarse mediante la ecuación:

$$n = \text{redondeo hacia arriba} \left(\frac{\ln X}{\ln(Y+1)} \right)$$
, y por lo tanto se pueden usar menos subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas. Sin embargo, no debe permitirse la combinación en la que todos los ciclos de lectura están oscuros.

Además, las subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas pueden diseñarse de modo que cada ciclo de lectura pueda iluminarse en múltiples colores. Así, 2^Y en lugar de Y se usa en la ecuación para n arriba y, por lo tanto, se pueden requerir menos subsecuencias de ácido nucleico predeterminadas. Sin embargo, no debe permitirse la combinación en la que todos los ciclos de lectura están oscuros.

Además, mientras que los colores se usan generalmente de forma binaria, es decir, ya sea que el color esté presente o no, en los ejemplos anteriores, la intensidad del color también se puede usar como parámetro de una firma de señal. Por ejemplo, si se permite que un marcador detectable se ilumine con el doble de brillo en un color diferente que otro, la capacidad de multiplexación puede expandirse aún más.

Las subsecuencias de ácidos nucleicos predeterminadas pueden construirse a partir de cualquier tipo de ácidos nucleicos, incluidos, pero sin limitarse a, ADN, ARN, PNA, LNA y cualquier combinación de los mismos.

Cada una de las subsecuencias predeterminadas del marcador de ácido nucleico puede tener cualquier longitud independientemente. En ciertas realizaciones, cada una de las subsecuencias predeterminadas puede comprender independientemente una longitud de aproximadamente 1 nucleobase a aproximadamente 100 nucleobases, de aproximadamente 1 nucleobase a aproximadamente 50 nucleobases, de aproximadamente 2 nucleobases a aproximadamente 50 nucleobases, de aproximadamente 5 nucleobases a aproximadamente 30 nucleobases, o de aproximadamente 5 nucleobases a aproximadamente 20 nucleobases. En algunas realizaciones, cada una de las subsecuencias predeterminadas puede comprender independientemente una o más nucleobases, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleobases.

La longitud alcanzable de las subsecuencias predeterminadas puede afectar el grado de multiplexabilidad. En algunas realizaciones, la longitud alcanzable de las subsecuencias predeterminadas puede ser una función de la intensidad de fluorescencia decreciente durante muchos ciclos de eliminación y rehibridación (es decir, difusión de las partículas secuenciables, degradación, aumento del ruido de fondo). En el caso de marcadores de ácido nucleico basadas en ADN o ARN que se amplifican *in situ*, se incorpora una base modificada durante su síntesis (es decir, dUTP, biotina, Acridita, aminoalelo), lo que permite que estos reactivos de detección se incrusten permanentemente en una película (independientemente del grosor de la película) de poliacrilamida funcionalizada (es decir, Acridita estreptavidina, NHS éster Acridita). Luego, el material incrustado se puede despojar y rehibridar durante muchos más ciclos sin alterar su arquitectura espacial y minimizando el ruido de fondo.

Se pueden conjugar juntas dos o más subsecuencias predeterminadas dentro de un marcador de ácido nucleico utilizando cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, dos o más subsecuencias

predeterminadas pueden conjugarse juntas mediante un enlazador de secuencias. El término "enlazador de secuencias", tal como se usa en este documento, generalmente se refiere a una entidad que conecta dos secuencias o subsecuencias, como se describe en este documento.

En algunas realizaciones, el enlazador de secuencia puede ser un enlace directo o un átomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre; una unidad tal como NR_1 , $\text{C}(\text{O})$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$, SO , SO_2 , SO_2NH ; o una cadena de átomos. Si es necesario, los dos extremos de las subsecuencias predeterminadas se pueden unir proporcionando en los dos extremos de las subsecuencias predeterminadas funcionalidades químicas complementarias que experimentan una reacción de acoplamiento. En realizaciones particulares, el enlazador de secuencia es un enlace directo que incluye, pero no se limita a, un enlace fosfodiéster. Por ejemplo, un átomo de carbono 3' de una base de azúcar en el nucleótido del extremo 5' de una primera subsecuencia predeterminada puede interactuar con el átomo de carbono 5' de otra base de azúcar en el nucleótido del extremo 3' de una segunda subsecuencia predeterminada para formar un enlace covalente, por ejemplo, un enlace fosfodiéster. Como tal, dos o más subsecuencias predeterminadas se pueden unir para formar una subsecuencia predeterminada más larga y contigua.

En algunas realizaciones, el enlazador de secuencia puede ser un enlazador nucleotídico. El término "enlazador nucleotídico", como se usa en el presente documento, se refiere a un enlazador de una longitud de un nucleótido o una secuencia que comprende sustancialmente una pluralidad de nucleótidos. En algunas realizaciones, el enlazador nucleotídico puede tener una longitud de secuencia de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o más nucleótidos. La longitud de la secuencia del enlazador nucleotídico puede variar con una serie de factores, por ejemplo, métodos de detección y/o propiedades de los marcadores ópticos. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, en algunas realizaciones, aumentar la longitud del enlazador nucleotídico puede aumentar la flexibilidad del marcador de ácido nucleico, por ejemplo, para aumentar la frecuencia de unión entre una secuencia predeterminada y una sonda decodificadora, cuyo término se discutirá más adelante. Sin embargo, un enlazador nucleotídico demasiado largo puede dar como resultado un marcador de ácido nucleico demasiado largo, que podría superponerse con otros marcadores de ácido nucleico de los reactivos de detección durante un ensayo y, por lo tanto, reducir la calidad y/o la precisión de la detección de la señal. Un experto en la técnica puede determinar la longitud óptima del enlazador nucleotídico sin experimentaciones innecesarias.

El enlazador nucleotídico puede tener cualquier estructura o conformación. En algunas realizaciones, el enlazador nucleotídico puede estar en una estructura seleccionada del grupo que consta de cadena sencilla, cadena doble, cadena parcialmente doble, una horquilla o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el enlazador de secuencias puede ser una perla o una nanopartícula que actúa como centro. En consecuencia, dos o más subsecuencias predeterminadas pueden conjugarse juntas de forma independiente a través de una perla o una nanopartícula.

Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, mientras que el enlazador de secuencias puede ser un enlace directo, un átomo, un enlazador nucleotídico o cualquier combinación de los mismos, el enlazador de secuencias también puede incluir una secuencia de aminoácidos, una cadena polimérica, una microperla, una nanopera o cualquier combinación de los mismos. Para proporcionar los enlaces entre el enlazador de secuencias, en algunas realizaciones, se pueden introducir diferentes funcionalidades en los extremos del enlazador de secuencias y/o las subsecuencias predeterminadas. Los ejemplos de funcionalidades incluyen, pero no se limitan a, grupos amida, incluidos derivados del ácido carbónico, éteres, ésteres, incluidos ésteres orgánicos e inorgánicos, amino, uretano, urea y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico es sustancialmente una secuencia polinucleotídica que contiene una o más subsecuencias predeterminadas. En dichas realizaciones, cualquiera de las dos subsecuencias predeterminadas se une o se conjugan entre sí mediante un enlace directo, tal como un enlace fosfodiéster (para producir una subsecuencia contigua más larga), un enlazador nucleotídico de cualquier longitud deseada o cualquier combinación de los mismos.

En tales realizaciones, el marcador de ácido nucleico del reactivo de detección se puede adaptar a cualquier configuración o estructura. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla, de cadena doble, parcialmente de cadena doble, una horquilla, lineal, circular, ramificado, un concatémico o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede ser una secuencia polinucleotídica lineal.

En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede ser una secuencia polinucleotídica circular. La ventaja de usar un marcador de ácido nucleico circular es que se puede amplificar usando amplificación de círculo rodante o amplificación de círculo rodante hiperramificado para generar una molécula de ácido nucleico larga y continua que contiene múltiples copias de las mismas secuencias de marcador de ácido nucleico unidas en serie (también conocido como concatémico), lo que da como resultado una señal amplificada. En algunas realizaciones, en lugar de preformar los reactivos de detección que comprenden el o los marcadores de ácido nucleico circular y el o los reactivos de sonda, se pueden sintetizar primero los reactivos de detección que comprenden polinucleótido o polinucleótidos lineales y el o los reactivos de sonda. Los marcadores de ácido nucleico circular se pueden agregar para hibridar con el o los

polinucleótidos lineales antes o después de que el o los reactivos de sonda se unan a los analitos. En tales realizaciones, si bien se requiere un etapa adicional, este enfoque puede tener la ventaja sobre la unión directa de marcadores de ácido nucleico circular porque no requiere la modificación química del marcador de ácido nucleico para la conjugación con los reactivos de la sonda, lo que da como resultado un marcador circular de ácido nucleico que es compatible con una gama más amplia de enzimas de amplificación. Además, los polinucleótidos lineales pueden ser más pequeños que los marcadores de ácido nucleico circulares secundarios, lo que facilita la difusión de los reactivos de sonda (y los reactivos de detección) a sus objetivos. En otras realizaciones, los polinucleótidos lineales pueden circularizarse usando una ligasa de cadena doble o de cadena sencilla adecuada, con o sin la adición de una plantilla de ligación adecuada. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, tales realizaciones pueden evitar la hibridación adicional que se requiere cuando se usa en su lugar un oligonucleótido previamente circularizado.

Cuando los reactivos de detección descritos en el presente documento se utilizan como sondas de FISH, los marcadores de ácido nucleico y las sondas de FISH pueden formar parte del mismo constructo de secuencia de ácido nucleico y, por lo tanto, la circularización puede abarcar el constructo completo (p. ej., tanto los marcadores de ácido nucleico como las sondas de FISH). Una representación esquemática de ejemplos de sondas de FISH para FISH SeqTagged se muestra en la Figura 13.

En algunas realizaciones, el método descrito en el presente documento se puede usar para identificar una clase a la que pertenece un analito, por ejemplo, un patógeno. Por ejemplo, el método se puede usar para identificar si un patógeno es Gram-negativo, Gram-positivo o alguna otra clase de patógeno, por ejemplo, levadura. Por lo tanto, el método descrito en este documento se puede utilizar como prueba de Gram para determinar si un patógeno sospechoso es Gram positivo, Gram negativo o levadura. Esto puede ser útil para identificar rápidamente el tipo de infección en un sujeto y administrar la terapia adecuada. Sólo a modo de ejemplo, esto puede lograrse usando un reactivo de detección que comprende una sonda específica de clase, también denominada "sonda similar a la tinción de Gram" en el presente documento. Nuevamente a modo de ejemplo solamente, la sonda puede ser una sonda de ADN para FISH.

En alguna realización, la sonda de FISH para identificar eubacterias puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT). Un ejemplo de sonda de FISH marcada con SeqTag para identificar eubacterias puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 (CTGCCTCCCGTAGGAGTTTTT CGCTTTAGCCTAAGGTGAAATC).

En algunas realizaciones, la sonda de FISH para identificar levaduras puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6 (CTCTGGCTTCACCCTATTC). Un ejemplo de sonda de FISH marcada con SeqTag para identificar levaduras puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 (CTCTGGCTTCACCCTATTCTTTTT CGCTTTTTTGGGGAAAAGACA).

En algunas realizaciones, la sonda de FISH para identificar firmicutes puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8 (CGGAAGATTCCCTACTGC). Un ejemplo de sonda de FISH marcada con SeqTag para identificar levaduras puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 (CGGAAGATTCCCTACTGCTTTTT CGCTTTCTGTAATGGAGTGGA).

En las sondas de FISH marcadas con SeqTag discutidas anteriormente, a cada sonda se le puede asignar una "firma de señal" particular para cada una de las tres etapas de lectura. Por ejemplo, los colores se pueden marcar en B, C y D. En algunas realizaciones, cada color puede ser de un fluoróforo diferente, tal como FAM, Cy3 y Cy5. Cada firma de señal puede aprovechar múltiples fluoróforos simultáneamente o incluso el mismo fluoróforo varias veces, por ejemplo, un SeqTag con firma de señal correspondiente a "DDDC".

Un ejemplo de firma de señal para identificar eubacterias, levaduras o firmicutes se muestra en la Tabla 1. Como se muestra, cada clase tiene un código asignado diferente para la primera etapa de lectura. Por ejemplo, para la primera lectura, a las eubacterias se les asigna el color C, la levadura el color D y las firmicutes el color B. En la lectura, las eubacterias aparecerán como el color C, la levadura como el color D, las firmicutes como los colores B y C.

Tabla 1

Nombre	Código asignado				Código efectivo			
	S1	S2	S3		S1	S2	S3	
Eubacterias-Kempff	C				C			
Todas las levaduras-Kempff	D				D			
Firmicutes-pB-00196	B				BC			

Después de identificar la clase de patógenos, los patógenos pueden ser sondeados adicionalmente para identificar el género o patógeno específico usando el método descrito en este documento. Por ejemplo, el reactivo de detección puede comprender una sonda específica de patógeno que se une a un patógeno específico o género de patógenos. Por ejemplo, la sonda puede ser una sonda de FISH que se une específicamente a un patógeno específico. Algunos ejemplos de sondas de FISH específicas de patógenos se muestran en Tabla 2.

Tabla 2

	Nombre	Secuencia de FISH de base de sonda	Código asignado		Código efectivo			
SEQ ID NO:	Gram +							
10	Staphylococcus spp-Kempf	TCCTCCATATCTCTGCGC	DD	B		BC	DD	B
11	S. aureus - Kempf	GAAGCAAGCTTCTCGTCCG	CD	B		BC	CDDD	BB
12	Streptococcus spp - Kempf	CACTCTCCCCTTCTGCAC	DD	D		BC	DD	D
13	S. pneumoniae - Kempf	GTGATGCAAGTGCACCTT	B	CC		BC	DDB	DDC
14	S. pyogenes - Kempf	TTCCAAAGCGTACATTGGTT	C	BD		BC	DDC	DDB
15	S. agalactiae - Kempf	GTAAACACCAAACMTCAGCG	D	CC		BC	DDD	DDC
16	B. subtilis-pB-00401	CGA AGG GGA CGT CCT ATC T	C	DD		BC	C	DD
17	L. acidophilus-pB-00711	CAG GCT TGC TCC TCG TTG	DD	C		BC	DD	C
	Gram -							
18	P. aeruginosa - Kempf	TCTCGGCCTTGAAACCCC	B	B		C	B	B
19	K. pneumoniae - Kempf	CCTACACACCAGCGTGCC	B	DD		C	B	DD
20	H. influenzae-pB-00348	CCG CAC TTT CAT CTT CCG	B	BC		C	B	BC
21	B. cepacia-pB-00346	CTG TGC GCC GGT TCT CTT	DD	B		C	DD	B
22	K. oxitoca-pB-01681	CTA CAA GAC TCC AGC CTG CC	DD	C		C	DD	C
23	E. coli-pB-02569-compl	ATG AGC AAA GGT ATT AAC TTT ACT CCC	B	C		C	B	C
24	Shewanella spp B-01191-mod	AGC TAA TCC CAC CTA GGT TCA TC	BC	B		C	BC	B
25	H. pylori-pB-00361	CACACCTGACTGACTATCCCG	C	B		C	C	B
	Levadura							
26	C. albicans - Kempf	GCCAAGGCTTATACTCGCT	C	BC		D	C	BC
27	C. glabrata - Kempf	CCGCCAAGCCACAAGGACT	C	CD		D	C	CD
28	C. krusei - Kempf	GATTCTCGGCCCCATGGG	BC	C		D	BC	C
29	C. parapsilosis - Kempf	CCTGGTTCGCCAAAAGGC	CD	C		D	CD	C

En la Tabla 3 se muestran ejemplos de sondas de FISH marcadas con SeqTag para identificar un patógeno específico. Como se muestra en la Tabla 3, a cada patógeno específico se le puede asignar una firma de señal específica basada en un color asignado para cada etapa de lectura y la identidad de un patógeno se puede decodificar usando esta tabla cuando el método se lleva a cabo usando este conjunto de codificación asignada.

Tabla 3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de sonda de FISH marcada con SeqTag
	Gram +	
30	Staphylococcus spp - Kempf	TCCTCCATATCTCTGCGCTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATTTT TCGCTTTTCGGTTCCAAAGACACTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCC A
31	S. aureus - Kempf	GAAGCAAGCTTCTCGTCCGTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATT TTTCGCTTTTCGGTTCCAAAGACACTTTTTCGCTTTGGAAGCACCTAT TCC
32	Streptococcus spp - Kempf	CACTCTCCCTTCTGCACCTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATTTT TCGCTTTTCACGATCCCATGTATTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCC A
33	S. pneumoniae - Kempf	GTGATGCAAGTGCACCTTTTTTCGCTTTGAAGCCGGTTATAGCTTT TTTCGCTTTTAGGCATTAGCATTGTTTTTCGCTTTTCACGATCCCATGT A
34	S. pyogenes - Kempf	TTCCAAAGCGTACATTGGTTTTTTCGCTTTTCGGTTCCAAAGACACT TTTTCGCTTTGGAAGCACCTATTCCTTTTTCGCTTTTCACGATCCCAT GTA
35	S. agalactiae - Kempf	GTAAACACCAACMTCAGCGTTTTTCGCTTTGAAGCCGGTTATAGC TTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATTTTTCGCTTTTCACGATCCC ATGTA
36	B. subtilis-pB-00401	CGA AGG GGA CGT CCT ATC TTTTTTCGCTTTTCACGATCCCATGTATTTTTCGCTTTGGAAGCACCT ATTCCTTTTTCGCTTTTCACGATCCCATGTA
37	L. acidophilus-pB - 00711	CAG GCT TGC TCC TCG TTGTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATTTTTCGCTTTGAAGCCG GTTATAGCTTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCA
	Gram -	
38	P. aeruginosa - Kempf	TCTCGGCCCTTGAAACCCCTTTTTCGCTTTTAGGCATTAGCATTGTTTT TCGCTTTTCGGTTCCAAAGACAC
39	K. pneumoniae - Kempf	CCTACACACCAGCGTGCCTTTTTTCGCTTTTCACGATCCCATGTATTTT TCGCTTTTAGGCATTAGCATTGTTTTTCGCTTTTCACGATCCCATGTA
40	H. influenzae-pB-00348	CCG CAC TTT CAT CTT CCGTTTTTCGCTTTTCGGTTCCAAAGACACTTTTTCGCTTTTAGGCATT AGCATTGTTTTTCGCTTTGAAGCCGGTTATAGC
41	B. cepacia-pB-00346	CTG TGC GCC GGT TCT CTTTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATTTTTCGCTTTTCGGTTCCA AAGACACTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCA
42	K. oxitoca-pB-01681	CTA CAA GAC TCC AGC CTG CCTTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATTTTTCGCTTTGAAGCCGG TTATAGCTTTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCA
43	E. coli-pB-02569-compl	ATG AGC AAA GGT ATT AAC TTT ACT CCCTTTTTTCGCTTTTAGGCATTAGCATTGTTTTTCGCTTTGAAGCCGG TTATAGC
44	Shewanella spp-pB-01191-mod	AGC TAA TCC CAC CTA GGT TCA TCTTTTTTCGCTTTTAGGCATTAGCATTGTTTTTCGCTTTTCGGTTCCAA AGACACTTTTTCGCTTTGGAAGCACCTATTCC
45	H. pylori-pB-00361	CACACCTGACTGACTATCCCGTTTTTCGCTTTGGAAGCACCTATTCC TTTTTCGCTTTTCGGTTCCAAAGACAC
	Levadura	
46	C. albicans - Kempf	GCCAAGGCTTATACTCGCTTTTTTTCGCTTTTCGGTTCCAAAGACACTT TTTCGCTTTGGAAGCACCTATTCCTTTTTCGCTTTGAAGCCGGTTATA GC

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de sonda de FISH marcada con SeqTag
	Gram +	
47	<i>C. glabrata</i> - Kempf	CCGCCAAGCCACAAGGACTTTTTTCGCTTTGAAGCCGTTATAGCTT TTTCGCTTTGGAAGCACCTATTCTTTTCGCTTTTCACGATCCCATG TA
48	<i>C. krusei</i> - Kempf	GATTCTCGGCCCCATGGGTTTTTCGCTTTTAGGCATTAGCATTGTTTT TCGCTTTGAAGCCGTTATAGCTTTTCGCTTTGGAAGCACCTATTCC C
49	<i>C. parapsilosis</i> - Kempf	CCTGGTTCGCCAAAAAGGCTTTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCATT TTTCGCTTTGAAGCCGTTATAGCTTTTCGCTTTGGAAGCACCTAT TCC

Como se muestra en Tabla 3, la "firma de señal" puede comprender múltiples "colores" de fluorescencia en cada etapa. Por ejemplo, *E. coli* se puede marcar como rojo en la etapa 1 y rojo + verde en la etapa 2 y azul en la etapa 3. La "firma de señal" también se puede codificar en el brillo del color en cada etapa. Por ejemplo, *E. coli* podría marcarse como rojo en la etapa 1 y 3 veces más rojo en la etapa 2.

Los ejemplos de sitios de hibridación para generar las diferentes firmas de señal en diferentes etapas utilizando los ejemplos de sondas de FISH marcadas con SeqTag descritas anteriormente se muestran en Tabla 4.

Tabla 4

SEQ ID NO:	"Color" asignado	
Conjunto 1		
50	B	CGCTTTCTGTAATGGAGTGGA
51	C	CGCTTTAGCCTAAGTGAAATC
52	D	CGCTTTTTTGGGAAAAGACA
Conjunto 2		
53	B	CGCTTTTAGGCATTAGCATTG
54	C	CGCTTTGGAAGCACCTATTCC
55	D	CGCTTTCTGGAGAAAGGGCCA
Conjunto 3		
56	B	CGCTTTTCGGTTCCAAAGACAC
57	C	CGCTTTGAAGCCGTTATAGC
58	D	CGCTTTTCACGATCCCATGTA

En algunas realizaciones, se pueden usar múltiples reactivos de detección para identificar un analito específico. Por ejemplo, se puede utilizar un primer conjunto de sondas para identificar si el patógeno potencial es gram-positivo, gram-negativo y luego otro conjunto de sondas para identificarlo más específicamente. Ambas sondas necesitarían producir una señal detectable, lo que permitiría usar, por ejemplo, la Tabla 3 para identificar de forma única el patógeno.

En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede ser un concatémero, que incluye una colonia o una nanobola de ADN que es lo suficientemente grande para actuar como una partícula en lugar de simplemente una hebra de ácido nucleico. El uso de un concatémero como marcador de ácido nucleico puede eliminar la necesidad de un tratamiento enzimático in situ de la amplificación de ácido nucleico circular, pero también puede aumentar el peso molecular total del reactivo de detección y, por lo tanto, retardar la difusión. De forma similar a los marcadores de ácido nucleico circular descritos anteriormente, se puede utilizar un ejemplo de enfoque de hibridación de concatémeros con los polipéptidos lineales de los reactivos de detección después de que los reactivos de la sonda se unan a los analitos para facilitar la difusión de los reactivos de la sonda (y los reactivos de detección) a sus objetivos.

Para aumentar la precisión y/o la especificidad de los métodos descritos en el presente documento, en diversas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede diseñarse para una mínima hibridación cruzada de bases entre sí. Varios programas o algoritmos computacionales reconocidos en la técnica están disponibles para diseñar secuencias de ácido nucleico con hibridación cruzada mínima. Por lo tanto, un experto en la técnica puede optimizar la secuencia del marcador de ácido nucleico utilizando cualquier método o algoritmo conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, los marcadores de ácido nucleico descritos en el presente documento pueden ser moléculas de ácido nucleico sintéticas (p. ej., ADN, ARN o híbridos de ADN/ARN) y pueden diseñarse racionalmente para tener características que optimicen la marcación y detección de los reactivos de detección y que eviten la formación de estructuras secundarias. En algunas realizaciones, un marcador de ácido nucleico es una secuencia polinucleotídica diseñada con una longitud de aproximadamente 50 a 50,000 bases.

En algunas realizaciones, los marcadores de ácido nucleico descritos en el presente documento pueden diseñarse para minimizar las estructuras secundarias predecibles y/o diseñarse de manera que cada marcador de ácido nucleico

pueda hibridar solo contra su propio objetivo. En algunas realizaciones, los marcadores de ácido nucleico descritos en el presente documento se pueden diseñar para que carezcan de cualquier estructura secundaria. Las estructuras secundarias putativas (por ejemplo, horquillas, plegado o emparejamiento interno de bases) se pueden predecir mediante métodos conocidos en la técnica, tales como MFOLD. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, en algunas realizaciones, la estructura secundaria predecible en el marcador de ácido nucleico se puede minimizar evitando las repeticiones invertidas y sesgando el contenido específico de la cadena principal de modo que la cadena principal de el marcador de ácido nucleico sea rica en CT o GA. Puede usarse cualquier método reconocido en la técnica, por ejemplo, MFOLD, para verificar si cada marcador de ácido nucleico puede hibridar solo contra su propio objetivo.

Las secuencias también pueden examinarse para evitar los sitios comunes de reconocimiento de enzimas de restricción de corte de seis bases. Las secuencias seleccionadas pueden someterse adicionalmente al análisis de la estructura secundaria predicha, y aquellas con la estructura secundaria mínima pueden elegirse para una evaluación adicional. Puede utilizarse cualquier programa conocido en la técnica para predecir la estructura secundaria, tal como el programa MFOLD (Zuker, 2003, *Nucleic Acids Res.* 31 (13): 3406-15; Mathews et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 288: 911-940).

En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede comprender solo un subconjunto de los nucleótidos A, G, C, T (y/o U) o nucleótidos modificados de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede comprender solo uno de los nucleótidos A, G, C, T (y/o U) o nucleótidos modificados de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede comprender dos de los nucleótidos A, C, T (y/o U) o nucleótidos modificados de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede comprender solo tres de los nucleótidos A, G, C y T (y/o U) o nucleótidos modificados de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede comprender solo cuatro de los nucleótidos A, G, C y T (y/o U) o nucleótidos modificados de los mismos. El subconjunto de los nucleótidos A, G, C y T (y/o U) o el nucleótido modificado de los mismos puede seleccionarse del grupo que consiste en A; G; C; T; U; (A, G); (C, A); (G, T); (G, U); (C, T); (C, U); (G, T, U); (C, T, U); (A, C, G); (A, G, T); (A, G, U); (A, C, T); (A, C, U); (C, G, T); (C, G, U); (A, C, T, U); y (C, G, T, U).

Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, el marcador de ácido nucleico puede ser un marcador de ácido nucleico modificado. Un ejemplo de modificación del marcador de ácido nucleico incluye, sin limitaciones, unir una o más moléculas detectables al marcador de ácido nucleico (ya sea en un extremo o a lo largo de la secuencia del marcador de ácido nucleico). La molécula detectable puede ser cualquier molécula óptica, incluidos, pero sin limitarse a, un colorante de molécula pequeña, una proteína fluorescente, un punto cuántico o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, al menos un extremo del marcador de ácido nucleico se puede modificar para incluir un grupo funcional químico y/o una proteína o péptido para facilitar la conjugación entre el marcador de ácido nucleico y el reactivo de sonda.

En algunas realizaciones, se puede modificar al menos uno (incluidos, por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más) ácidos nucleicos o nucleótidos presentes en el marcador de ácido nucleico. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una o más modificaciones de ácido nucleico como se describe en el presente documento, p. ej., seleccionado del grupo que consiste en modificaciones de enlaces entre nucleótidos (modificaciones de enlaces entre azúcares), modificaciones de azúcares, modificaciones de nucleobases, modificaciones/reemplazos de la cadena principal, y cualquier combinación de los mismos.

Conjugación entre un marcador de ácido nucleico y un reactivo de sonda

De acuerdo con las realizaciones, el reactivo de detección comprende al menos un reactivo de sonda y al menos un marcador de ácido nucleico, donde el reactivo de sonda y el marcador de ácido nucleico pueden conjugarse entre sí mediante cualquier método conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, el reactivo de sonda y el marcador de ácido nucleico se pueden unir o conjugar entre sí mediante un enlazador. Como se usa en el presente documento, el término "enlazador" generalmente se refiere a una entidad que conecta el reactivo de sonda y el marcador de ácido nucleico entre sí. El enlazador puede ser monovalente o multivalente. El término "monovalente", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un enlazador para unir un reactivo de sonda a un marcador de ácido nucleico. El término "multivalente", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un enlazador para unirse a uno o más reactivos de sonda y/o marcadores de ácido nucleico. En algunas realizaciones, un enlazador multivalente puede unir al menos un reactivo de sonda a una pluralidad de marcadores de ácido nucleico (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más marcadores de ácido nucleico).

En algunas realizaciones, el término "enlazador" significa una fracción orgánica que conecta dos partes de un compuesto. Dichos enlazadores normalmente comprenden un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad tal como NH, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, SS o una cadena de átomos, tal como alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alquienilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido, alquinilo C₂-C₆ sustituido o no sustituido, arilo C₆-C₁₂ sustituido o no sustituido, heteroarilo C₅-C₁₂ sustituido o no sustituido, heterociclilo C₅-C₁₂ sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido o no sustituido donde uno o más metilenos pueden ser interrumpidos o terminados por O, S, S(O), SO₂, NH, C(O).

En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador ramificado. El punto de ramificación del enlazador ramificado puede ser al menos trivalente, pero puede ser un átomo tetravalente, pentavalente o hexavalente, o un grupo que presente tales valencias múltiples. En algunas realizaciones, el punto de ramificación es -N, -N(R)-C, -O-C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(R)-C, -OC(O)N(R)-C, -N(R)C(O)-C o -N(R)C(O)O-C; donde R es independientemente para cada aparición H o alquilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el punto de ramificación es glicerol o un derivado del mismo.

En algunas realizaciones, el enlazador comprende un grupo enlazante escindible. Como se usa en el presente documento, un "grupo de enlace escindible" es una fracción química que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que al entrar en una célula objetivo se escinde para liberar las dos partes que el enlazador mantiene unidas. En una realización preferida, el grupo de enlace escindible se escinde al menos 10 veces o más, preferiblemente al menos 100 veces más rápido en la célula objetivo o bajo una primera condición de referencia (que puede, por ejemplo, seleccionarse para imitar o representar condiciones intracelulares) que en la sangre o suero de un sujeto, o bajo una segunda condición de referencia (que puede, por ejemplo, seleccionarse para imitar o representar condiciones encontradas en la sangre o suero).

Los grupos de enlace escindibles son susceptibles a agentes de escisión, por ejemplo, pH, potencial redox o la presencia de moléculas degradantes. Generalmente, los agentes de escisión son más frecuentes o se encuentran en niveles o actividades más altos dentro de las células que en el suero o la sangre. Los ejemplos de tales agentes degradantes incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad de sustrato, incluyendo, por ejemplo, enzimas oxidativas o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo de unión escindible redox por reducción; esterasas; amidasas; endosomas o agentes que pueden crear un entorno ácido, p. ej., aquellos que dan como resultado un pH de cinco o menos; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo de enlace escindible con ácido actuando como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas del sustrato) y proteasas y fosfatasas.

Un enlazador puede incluir un grupo de enlace escindible que es escindible por una enzima particular. El tipo de grupo enlazante escindible incorporado en un enlazador puede depender de la célula a la que se dirige. Por ejemplo, para direccionamiento al hígado, los grupos de enlace escindibles pueden incluir un grupo éster. Las células hepáticas son ricas en esterasas y, por lo tanto, el enlazador se escindiría de manera más eficiente en las células hepáticas que en los tipos de células que no son ricas en esterasas. Otros tipos de células ricas en esterasas incluyen células de pulmón, corteza renal y testículos.

Los enlazadores que contienen enlaces peptídicos se pueden usar cuando se dirigen a tipos de células ricas en peptidasas, tal como células hepáticas y sinoviocitos.

En algunas realizaciones, el grupo de enlace escindible se escinde al menos 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares). En algunas realizaciones, el grupo de unión escindible se escinde en menos del 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % en la sangre (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares) en comparación con la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares).

Los ejemplos de grupos enlazantes escindibles incluyen, pero no se limitan a, grupos enlazantes escindibles redox (por ejemplo, -S-S- y -C(R)₂-S-S-, donde R es H o alquilo C₁-C₆ y al menos un R es alquilo C₁-C₆ tal como CH₃ o CH₂CH₃); grupos de enlace escindibles a base de fosfato (por ejemplo, -OP(O)(OR)-O-, -OP(S)(OR)-O-, -OP(S)(SR)-O-, -SP(O)(OR)-O-, -OP(O)(OR)-S-, -SP(O)(OR)-S-, -OP(S)(ORk)-S-, -SP(S)(OR)-O-, -OP(O)(R)-O-, -OP(S)(R)-O-, -SP(O)(R)-O-, -SP(S)(R)-O-, -SP(O)(R)-S-, -OP(S)(R)-S-, -OP(O)(OH)-O-, -OP(S)(OH)-O-, -OP(S)(SH)-O-, -SP(O)(OH)-O-, -OP(O)(OH)-S-, -SP(O)(OH)-S-, -OP(S)(OH)-S-, -SP(S)(OH)-O-, -OP(O)(H)-O-, -OP(S)(H)-O-, -SP(O)(H)-O-, -SP(S)(H)-O-, -SP(O)(H)-S- y -OP(S)(H)-S-, donde R es alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado opcionalmente sustituido); grupos enlazantes escindibles por ácidos (p. ej., hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos, -C=NN- y -OC(O)-); grupos de unión escindibles basados en éster (p. ej., -C(O)O-); grupos de enlace escindibles basados en péptidos (por ejemplo, grupos de enlace que son escindidos por enzimas como peptidasas y proteasas en las células, por ejemplo, -NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)-, donde R^A y R^B son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes). Un grupo de enlace escindible basado en un péptido comprende dos o más aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlace de escisión basado en péptidos comprende la secuencia de aminoácidos que es el sustrato para una peptidasa o una proteasa que se encuentra en las células.

En algunas realizaciones, un grupo enlazador escindible con ácido es escindible en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6.5 o inferior (p. ej., aproximadamente 6.0, 5.5, 5.0 o inferior) o mediante agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general.

Además de los enlaces covalentes, dos partes de un compuesto pueden unirse mediante un par de unión por afinidad. El término "par de unión por afinidad" o "par de unión" se refiere a una primera y segunda moléculas que se unen específicamente entre sí. Un miembro del par de unión se conjuga con la primera parte que se enlaza mientras que el segundo miembro se conjuga con la segunda parte que se enlaza. Como se usa en el presente documento, el término

"unión específica" se refiere a la unión del primer miembro del par de unión al segundo miembro del par de unión con mayor afinidad y especificidad que con otras moléculas.

Ejemplos de pares de unión incluyen cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo correspondiente o porción de unión o fragmento del mismo (p. ej., digoxigenina y antidigoxigenina; inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina de cabra antirratón) y pares de unión no inmunológicos (p. ej., biotina-avidina, biotina-estreptavidina, biotina-neutravidina, hormona [p. ej., tiroxina y proteína de unión a la hormona cortisol, agonista receptor-receptor, antagonista receptor-receptor (p. ej., receptor de acetilcolina-acetilcolina o un análogo del mismo), IgG-proteína A, IgG-proteína G, IgG-proteína AG sintetizada, lectina-carbohidrato, cofactor enzima-enzima, inhibidor de enzima-enzima y pares de oligonucleótidos complementarios capaces de formar dúplex de ácido nucleico), y similares. El par de unión también puede incluir una primera molécula que está cargada negativamente y una segunda molécula que está cargada positivamente.

Un ejemplo del uso de la conjugación de pares de unión es la conjugación biotina-avidina, biotina-estreptavidina o biotina-neutravidina. En este enfoque, uno de la molécula o el péptido se biotinila y el otro se conjuga con avidina o estreptavidina. Muchos kits comerciales también están disponibles para biotinar moléculas, tal como proteínas.

Otro ejemplo del uso de la conjugación de pares de unión es el método de sándwich de biotina. Véase, p.ej., Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 103: 8155-60 (2006). Las dos moléculas que se van a conjugar entre sí se biotinilan y luego se conjugan entre sí usando al menos una molécula similar a la avidina tetravalente (por ejemplo, avidina, estreptavidina o neutravidina) como enlazador.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, tanto la marca o marcas de ácido nucleico como el reactivo o reactivos de sonda se pueden biotinar y luego unir entre sí usando una molécula similar a la avidina (p. ej., avidina, estreptavidina o neutravidina). En una realización, se usa neutravidina y/o estreptavidina como enlazador para unir la marca o marcas de ácido nucleico biotiniladas, por ejemplo, la secuencia o secuencias de ADN, y el reactivo o reactivos de sonda biotinilados, por ejemplo, anticuerpo. Sin desear limitarse a la teoría, cada molécula similar a la avidina (por ejemplo, avidina, estreptavidina o neutravidina) generalmente tiene cuatro sitios de unión, por lo que como máximo se pueden unir cuatro moléculas. Por ejemplo, un reactivo de sonda biotinilado puede unirse, a través de una molécula similar a la avidina (por ejemplo, avidina, estreptavidina o neutravidina), a tres marcadores de ácido nucleico biotinilado, o en cualquier otra combinación (por ejemplo, dos reactivos de sonda biotinilados unidos a dos marcadores de ácido nucleico biotinilado).

La biotilación de un marcador de ácido nucleico (es decir, unir una biotina a un marcador de ácido nucleico) puede ocurrir en cualquier ubicación del marcador de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el marcador de ácido nucleico se puede sintetizar o modificar con una biotina terminal, es decir, el marcador de ácido nucleico puede tener una biotina en su extremo 5' y/o extremo 3'. En otras realizaciones, el marcador de ácido nucleico puede sintetizarse o modificarse con una biotina interna, es decir, el marcador de ácido nucleico puede tener una biotina en cualquier lugar entre sus extremos 5' y 3', pero no en sus extremos 5' y/o 3'. Dicha biotilación interna puede dejar al menos un extremo (p. ej., ambos extremos) de el marcador de ácido nucleico accesible, lo que permite que el marcador de ácido nucleico se haga circular después de que se haya unido el marcador de ácido nucleico, lo que a su vez puede, por ejemplo, permitir la amplificación por círculo rodante como se describió anteriormente. La modificación química del marcador de ácido nucleico, por ejemplo, para unir una biotina terminal y/o interna al marcador de ácido nucleico después de la síntesis, está dentro del alcance de un experto en la técnica.

Para algunas realizaciones en las que el reactivo de sonda es un ácido nucleico, un ejemplo del uso de la conjugación de pares de unión es la conjugación de ácido nucleico de doble cadena. En este enfoque, la primera parte que se va a unir se conjuga con la primera cadena del ácido nucleico de doble cadena y la segunda parte que se va a unir se conjuga con la segunda cadena del ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos pueden incluir, sin limitación, segmentos de secuencia definidos y secuencias que comprenden nucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados y nucleótidos que comprenden modificaciones de la cadena principal, puntos de ramificación y residuos, grupos o puentes que no son de nucleótidos.

En algunas realizaciones, el enlazador puede ser una molécula enlazadora. Los ejemplos de moléculas enlazadoras pueden incluir, pero sin limitarse a, un polímero, azúcar, ácido nucleico, péptido, proteína, hidrocarburo, lípido, polietilenglicol, un agente de entrecruzamiento o una combinación de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de agentes de entrecruzamiento que se pueden usar como moléculas de enlazadoras pueden incluir, pero sin limitarse a, entrecruzadores de amina con amina (p. ej., pero sin limitarse a, los basados en grupos reactivos NHS-éster y/o imidoéster), entrecruzadores de amina con sulfhidrilo, entrecruzadores de carboxilo con amina (p. ej., pero sin limitarse a, agentes de entrecruzamiento de carbodiimida tales como DCC y/o EDC (EDAC); y/o N-hidroxisuccinimida (NHS)), entrecruzadores fotoreactivos (p. ej., pero sin limitarse a, arilazida, diazirina y cualquier de los reactivos de entrecruzamiento químico fotoreactivos (activados por la luz) reconocidos en la técnica), entrecruzadores de sulfhidrilo con carbohidrato (p. ej., pero no se limitan a los basados en grupos reactivos de maleimida y/o hidrazida), entrecruzadores de sulfhidrilo con hidroxilo (p. ej., pero no se limitan a los basados en grupos reactivos de maleimida y/o isocianato), entrecruzadores de sulfhidrilo con sulfhidrilo (p. ej., pero no se limitan a, grupos reactivos de maleimida y/o piridilditiol), entrecruzadores de sulfo-SMCC, reactivos de transferencia de marcadores de

biotina sulfo-SBED, reactivos de transferencia de marcadores de biotina a base de sulfhidrilo, aminoácidos fotorreactivos (p. ej., pero no se limitan a análogos de diazirina, de leucina y/o metionina), reactivos de ligadura de NHS-azida de Staudinger (p. ej., pero no se limitan a, compuestos azido activados), reactivos de ligación de NHS-fosfina de Staudinger (p. ej., pero no se limitan a, compuestos de fosfina activada), y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, cualquier agente de entrecruzamiento disponible en el mercado (p. ej., pero sin limitarse a los de Thermo Scientific o Piercenet, Rockford, IL) pueden usarse como una molécula de enlace en este documento.

En algunas realizaciones, el término "enlazador" como se usa en este documento puede ser un sustrato físico. En algunas realizaciones, el sustrato físico es una partícula. La partícula puede tener cualquier forma, por ejemplo, esferas; varillas; conchas; perlas, tubos, alambres y prismas; y estas partículas pueden ser parte de una red.

Las partículas pueden estar hechas de cualquier material. En algunas realizaciones, la partícula puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en metal (p. ej., oro o hierro), óxidos metálicos (p. ej., óxido de hierro), plástico, vidrio, polímero (p. ej., poliestireno) y cualquier combinación de los mismos.

Para fines *in vivo*, por ejemplo, diagnóstico de enfermedades y/o patógenos y/o administración dirigida de fármacos, el polímero puede ser biocompatible y/o biodegradable. El término "polímero biocompatible" se refiere a polímeros que, en las cantidades empleadas, no son tóxicos y sustancialmente no inmunogénicos cuando se usan internamente en el paciente y que son sustancialmente insolubles en el fluido corporal del mamífero. Los ejemplos de polímeros biocompatibles no biodegradables incluyen, a modo de ejemplo, acetatos de celulosa (incluido el diacetato de celulosa), copolímeros de alcohol vinílico de etileno, hidrogeles (por ejemplo, acrílicos), poliácridonitrilo, acetato de polivinilo, butirato de acetato de celulosa, nitrocelulosa, copolímeros de uretano/carbonato, copolímeros de estireno/ácido maleico y cualquier combinación de los mismos. Los polímeros biodegradables son conocidos en la técnica, por ejemplo, sin limitaciones, polímeros de cadena lineal tales como poliláctidos, poliglicólidos, policaprolactonas, polianhídridos, poliamidas, poliuretanos, poliesteramidas, poliortoésteres, polidioxanonas, poliacetales, policetales, policarbonatos, poliortocarbonatos, polifosfacenos, polihidroxitbutiratos, polihidroxisvaleratos, oxalatos de polialquileño, succinatos de polialquileño, poli(ácido málico), poli(aminoácidos), polivinilpirrolidona, polietilenglicol, polihidroxixelulosa, quitina, quitosa y copolímeros, terpolímeros y cualquier combinación de los mismos. Otros polímeros biodegradables incluyen, por ejemplo, fibrina, gelatina, colágeno y cualquier combinación de los mismos.

Las partículas pueden ser de cualquier tamaño, siempre que el tamaño de las partículas no afecte significativamente la propiedad de difusión del reactivo de detección. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede variar de 5 nm a 1 mm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 500 μm , o de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 250 μm . En algunas realizaciones, una partícula descrita en este documento es una nanopartícula o una micropartícula. Como se usa en este documento, el término "nanopartícula" se refiere a partículas que son del orden de 10^{-9} o la mil millonésima parte de un metro y menos de 10^{-6} o 1 millonésima de metro de tamaño. El término "micropartícula", como se usa en este documento, se refiere a partículas que son del orden de 10^{-6} o una millonésima de metro y menos de 10^{-3} o 1 milésima de metro de tamaño. En algunas realizaciones, la partícula se puede seleccionar de un grupo que consiste en una nanopartícula o micropartícula de oro, una nanopartícula o micropartícula paramagnética, una nanopartícula o micropartícula magnética, una nanopartícula o micropartícula de poliestireno, un nanotubo o un microtubo, un nanoalambre o un microalambre, y cualquier combinación de los mismos.

Las partículas se pueden adaptar para que posean al menos una propiedad adicional, dependiendo de varias aplicaciones. En algunas realizaciones, las partículas se pueden adaptar para que respondan magnéticamente o paramagnéticamente, por ejemplo, partículas magnéticas o paramagnéticas. En algunas realizaciones, las partículas pueden adaptarse para ser un vehículo de suministro. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las partículas se pueden encapsular con un agente terapéutico, por ejemplo, para la administración dirigida de fármacos para tratar una enfermedad o trastorno.

En algunas realizaciones, las partículas pueden modificarse. Por ejemplo, las partículas se pueden conjugar con proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o cualquier combinación de los mismos. En una realización, las partículas pueden conjugarse en la superficie o recubrirse con un miembro del par de unión como se describió anteriormente (p. ej., para la interacción biotina-estreptavidina, se pueden usar partículas recubiertas con estreptavidina). En algunas realizaciones, las partículas pueden activarse en la superficie con grupos funcionales (p. ej., pero sin limitarse a, amina, ácido carboxílico, epoxi, tosilo, silano y cualquier combinación de los mismos), p. ej., para proporcionar sitios de unión para reactivos de sonda y/o marcadores de ácido nucleico. Los métodos para modificaciones superficiales de partículas, tales como nanopartículas o micropartículas, son bien conocidos en la técnica. Un experto en la técnica puede modificar o activar fácilmente la superficie de las partículas utilizando cualquier reacción reconocida en la técnica, por ejemplo, covalentemente a través de entrecruzadores o mediante la interacción de proteínas.

Las partículas descritas en el presente documento se pueden usar junto con el enlazador orgánico descrito anteriormente, para formar un enlazador conjugado, o las partículas se pueden usar solas como enlazador. Tanto los marcadores de ácido nucleico como los reactivos de la sonda se pueden acoplar a las partículas utilizando una multitud de métodos. Estos incluyen, pero no se limitan a, unión covalente directa tal como el uso de entrelazadores químicos

basados en químicas tales como NHS, maleimida, tosilo, isocianuro, etc.; enlace químico tal como el uso de química EDC, adsorción de tiol con oro, reacción de radical vinilo/acrilato, adición basada en acrilato (de, por ejemplo, tioles); y acoplamientos mediados por proteínas basados en proteínas tales como estreptavidina (y sus parientes tales como avidina, neutravidina, etc.), proteína A y anticuerpos secundarios, y cualquier combinación de los mismos.

- 5 Las partículas pueden actuar como concentradores que facilitan la conjugación de múltiples marcadores de ácido nucleico con sondas únicas o múltiples. Según las aplicaciones y/o las propiedades de los marcadores de ácido nucleico y/o los reactivos de sonda, las partículas se pueden usar como centros para la conjugación múltiple. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al actuar como un centro, las partículas pueden permitir que estén presentes múltiples marcadores de ácido nucleico en cada ubicación (p. ej., ubicación de una molécula objetivo o analito) donde se une la sonda. En consecuencia, la señal generada por el reactivo de detección puede amplificarse y, por lo tanto, ser mayor que si estuviera presente un único marcador. Esto es especialmente deseable cuando los antígenos/objetivos o analitos son escasos en una muestra.

- 10 En algunas realizaciones, las partículas pueden permitir que se dispongan múltiples sondas en proximidad entre sí. Por lo tanto, las partículas pueden permitir que varios eventos de unión más débiles se combinen en una unión fuerte. Esta "acción de avidez" puede transformar reactivos de sonda con afinidades débiles individualmente en sensores efectivos.

- 15 En algunas realizaciones, al actuar como un concentrador, las partículas pueden permitir que cada reactivo de sonda se conjuge con múltiples marcadores de ácido nucleico. Esta capacidad puede eliminar la necesidad de otros métodos de amplificación (p. ej., amplificación de círculo rodante) ya que se pueden usar múltiples marcadores de ácido nucleico correspondientes a un reactivo de sonda como una forma de amplificación de señal. En algunas realizaciones, esta capacidad también se puede usar para separar los reactivos de detección con un marcador de ácido nucleico de los que tienen diferentes marcadores de ácido nucleico, lo que, a su vez, puede permitir, por ejemplo, la secuenciación por extensión de base única. Además, se pueden conjugar diferentes marcadores de ácido nucleico con las partículas en proporciones controladas, y las proporciones pueden codificar información adicional. Únicamente a modo de ejemplo, para capturar información *in situ* del comportamiento de una o más enzimas (p. ej., concentración relativa de la enzima) en presencia de un analito, se pueden conjugar dos o más marcadores de ácido nucleico diferentes con las partículas, en las que una subpoblación de los marcadores de ácido nucleico correspondiente al reactivo de sonda no es escindible, mientras que otras subpoblaciones de los marcadores de ácido nucleico están adaptadas para ser escindibles en presencia de sus respectivas enzimas. En dichas realizaciones, los marcadores de ácido nucleico escindibles se pueden conjugar con las partículas mediante enlaces peptídicos escindibles específicos para las enzimas correspondientes. Comparando las proporciones de las señales generadas a partir de los diversos marcadores de ácido nucleico, se podrían determinar las concentraciones relativas de enzima en presencia de un analito.

- 20 La disposición del reactivo o reactivos de sonda y/o marcador o marcadores de ácido nucleico en las partículas puede variar con una serie de factores, por ejemplo, aplicaciones, propiedades de los reactivos de sonda y/o marcadores de ácido nucleico, propiedades de la muestra y/o analitos de interés. En algunas realizaciones, los reactivos de sonda y los marcadores de ácido nucleico se pueden conjugar directamente con la partícula (véase, por ejemplo, la Figura 4A). En algunas realizaciones, un componente puede unirse a la partícula a través del otro. En tales realizaciones, los reactivos de la sonda se pueden conjugar o unir a la partícula a través de los marcadores de ácido nucleico (véase, por ejemplo, la Figura 4B), por ejemplo, para permitir que los reactivos de la sonda sean más accesibles por los analitos correspondientes en una muestra.

- 25 En algunas realizaciones, los reactivos de detección pueden comprender además al menos un enlazador de sustrato conjugado con la partícula. En tal realización, el enlazador de sustrato puede permitir que los reactivos de detección se inmovilicen en un soporte o sustrato sólido.

45 Moléculas detectables o marcadores detectables

- Una molécula detectable o un marcador detectable se puede unir covalentemente a una sonda decodificadora o nucleobase complementaria antes o después de que la sonda decodificadora o la nucleobase complementaria se unan a las subsecuencias predeterminadas o sitios de hibridación de un marcador de ácido nucleico. Por ejemplo, al unir un marcador detectable a una sonda decodificadora, el marcador se puede unir covalentemente mediante la incorporación de un nucleótido que contiene un marcador detectable en el ácido nucleico durante su síntesis, pero antes de hibridar con la subsecuencia predeterminada del marcador de ácido nucleico. Alternativamente, durante la síntesis de una secuencia de sonda decodificadora, se puede incluir un nucleótido que contenga un grupo aceptor de marcador detectable, y el marcador detectable se puede agregar a la sonda decodificadora después de su síntesis, ya sea antes o después de que se hibrida con las subsecuencias predeterminadas del marcador de ácido nucleico. Alternativamente, el marcador detectable se puede unir indirectamente a la sonda decodificadora, por ejemplo, incorporando un nucleótido que contiene una molécula de unión a ligando (p. ej., biotina) en la sonda decodificadora durante la síntesis, y agregando un ligando (p. ej., estreptavidina) que se une covalentemente a la molécula detectable, o viceversa.

En algunas realizaciones, las proporciones de un marcador detectable a una sonda decodificadora pueden oscilar desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 100:1, desde 1:1 hasta aproximadamente 50:1, desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 25:1, desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 10:1, o desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 5:1. Cuando una sonda decodificadora comprende más de un

Se puede unir un marcador detectable o una molécula detectable a cualquier nucleótido, incluidos los nucleótidos tanto naturales como no naturales. Un nucleótido contiene tres partes, un grupo fosfato, una molécula de azúcar de cinco carbonos de pentosa y una base orgánica. En el ARN, la pentosa es la ribosa y en el ADN es la desoxirribosa, por lo que los nucleótidos que se incorporan al ARN se denominan ribonucleótidos y los nucleótidos que se incorporan al ADN se denominan desoxirribonucleótidos. Las tres bases adenina, guanina y citosina se encuentran tanto en el ADN como en el ARN, mientras que la timina normalmente se encuentra solo en el ADN y el uracilo normalmente se encuentra solo en el ARN. Los nucleótidos pueden tener uno, dos o tres grupos fosfato unidos y, a veces, se denominan fosfatos de nucleósidos. Los nucleótidos pueden contener nucleósidos modificados que tienen bases modificadas (p. ej., 5-metil citosina) y grupos azúcar modificados (p. ej., 2'-O-metil ribosilo, 2'-O-metoxietilo ribosilo, 2'fluoro ribosilo, 2'amino ribosilo y similares). Un ejemplo de bases no naturales que se utilizan en la técnica son la isocitidina y la isoguanina.

Un marcador detectable o una molécula detectable como se usa en el presente documento pretende significar una fracción medible individual, tal como un radioisótopo, fluorocromo, colorante, enzima (incluido su efecto sobre un sustrato), nanopartícula, marcador quimioluminiscente, biotina u otra fracción conocida en la técnica que se puede medir mediante métodos analíticos. Se puede unir un marcador detectable o una molécula detectable a un nucleótido utilizando métodos bien conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento.

Sin limitaciones, los ejemplos de un marcador detectable o una molécula detectable que se puede utilizar pueden incluir indicadores ópticos o marcadores ópticos. Los indicadores ópticos o marcadores ópticos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, indicadores fluorescentes y grupos quimioluminiscentes. En la técnica se conoce una amplia variedad de colorantes indicadores fluorescentes. Normalmente, el fluoróforo es un compuesto aromático o heteroaromático y puede ser un pireno, antraceno, naftaleno, acridina, estilbeno, indol, bencindol, oxazol, tiazol, benzotiazol, cianina, carbocianina, salicilato, antranilato, cumarina, fluoresceína, rodamina u otro compuesto similar. Los indicadores fluorescentes adecuados incluyen tintes de xanteno, tales como tintes de fluoresceína o rodamina, incluidos, pero sin limitarse a, colorantes Alexa Fluor® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, California), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green^{MC}, rodamina, Texas Red, isotiocianato de tetra-rodamina (TRITC), 5-carboxifluoresceína (FAM), 2'-7'-dimetoxi-4'-5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), tetraclorofluoresceína (TET), 6-carboxirrodamina (R6G), N,N,N,N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX). Los indicadores fluorescentes adecuados también incluyen los colorantes de naftilamina que tienen un grupo amino en la posición alfa o beta. Por ejemplo, los compuestos de naftilamino incluyen 1-dimetilamino-naftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftalenosulfonato, 2-p-toluidinil-6-naftalenosulfonato y ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS). Otros colorantes indicadores fluorescentes incluyen cumarinas, tales como 3-fenil-7-isocianatocumarina; acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; cianinas, tales como Cy2, indodicarbocianina 3 (Cy3), indodicarbocianina 5 (Cy5), indodicarbocianina 5.5 (Cy5.5), 3-(-carboxi-pentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarboxianina (CyA); 1H,5H,11H,15H-xanteno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizina-18-io, 9-[2(o 4)-[[[6-[2,5-dioxo-1-pirrolidinil]oxil]-6-oxohexil]amino]sulfonil]-4(o 2)-sulfofenil]-2,3,6,7,12,13,16,17octahidro-sal interna (TR o Texas Red); colorantes BODIPY^{MC}; benzoxadiazoles; estilbenos; pirenos; y similares. Muchas formas adecuadas de estos compuestos fluorescentes están disponibles y pueden usarse.

Los ejemplos de proteínas fluorescentes adecuadas para su uso como agentes de formación de imágenes incluyen, pero sin limitarse a, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja (por ejemplo, DsRed), proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente azul y variantes de las mismas (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,403,374, 6,800,733, y 7,157,566). Los ejemplos específicos de variantes de GFP incluyen, pero sin limitarse a, GFP mejorada (EGFP), EGFP desestabilizada, las variantes de GFP descritas en Doan et al., Mol. Microbiol., 55: 1767-1781 (2005), la variante de GFP descrita en Crameri et al., Nat. Biotechnol., 14: 315319 (1996), las proteínas fluorescentes cerúleas descritas en Rizzo et al., Nat. Biotechnol., 22: 445 (2004) y Tsien, Annu. Rev. Biochem., 67: 509 (1998), y la proteína fluorescente amarilla descrita en Nagal et al., Nat. Biotechnol., 20: 87-90 (2002). Las variantes de DsRed se describen, por ejemplo, en Shaner et al., Nat. Biotechnol., 22: 1567-1572 (2004), e incluyen mStrawberry, mCherry, morange, mBanana, mHoneydew y mTangerine. Las variantes adicionales de DsRed se describen en, por ejemplo, Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 101: 16745-16749 (2004) e incluyen mRaspberry y mPlum. Otros ejemplos de variantes de DsRed incluyen mRFPmars descritos en Fischer et al., FEBS Lett., 577: 227-232 (2004) y mRFPruby descrito en Fischer et al., FEBS Lett., 580: 2495-2502 (2006).

Los fluoróforos reactivos con amina y tiol están disponibles y generalmente se usan para marcar nucleótidos y biomoléculas. En algunas realizaciones, los nucleótidos se marcan con fluorescencia durante la síntesis química, por ejemplo, la incorporación de aminas o tioles durante la síntesis de nucleótidos permite la adición de fluoróforos. Los nucleótidos marcados con fluorescencia están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los trifosfatos de uridina y desoxiuridina están disponibles que se conjugan con diez fluoróforos diferentes que cubren el espectro.

En algunas realizaciones, los radioisótopos se pueden utilizar como moléculas detectables o moléculas detectables para marcar nucleótidos que incluyen, por ejemplo, ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H y ^{125}I . Estos radioisótopos tienen diferentes vidas medias, tipos de descomposición y niveles de energía que se pueden adaptar para satisfacer las necesidades de un experimento en particular. Por ejemplo, ^3H es un emisor de baja energía que da como resultado bajos niveles de fondo; sin embargo, esta baja energía también da como resultado largos períodos de tiempo para la autorradiografía. Los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos marcados radiactivamente están disponibles comercialmente. Hay nucleótidos disponibles que están marcados radiactivamente en el primer grupo o α fosfato, o en el tercer grupo o γ fosfato. Por ejemplo, tanto $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ como $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ están disponibles comercialmente. Además, también están disponibles comercialmente diferentes actividades específicas para nucleótidos marcados radiactivamente y se pueden adaptar para diferentes experimentos.

Los isótopos no metálicos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, ^{11}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{18}F , ^{123}I , ^{124}I y ^{125}I . Los radioisótopos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{95}Tc , ^{111}In , ^{62}Cu , ^{64}Cu , Ga , ^{68}Ga , y ^{153}Gd . Los iones metálicos paramagnéticos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, Gd(III) , Dy(III) , Fe(III) y Mn(II) . Los absorbentes de rayos X adecuados incluyen, pero sin limitarse a, Re , Sm , Ho , Lu , Pm , Y , Bi , Pd , Gd , La , Au , Au , Yb , Dy , Cu , Rh , Ag e Ir . En algunas realizaciones, el radionúclido se une a un agente quelante o enlazador de agente quelante unido al agregado. Los radionúclidos adecuados para la conjugación directa incluyen, sin limitación, ^{18}F , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , y mezclas de los mismos. Los radionúclidos adecuados para usar con un agente quelante incluyen, sin limitación, ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , y mezclas de los mismos. Los agentes quelantes adecuados incluyen, pero sin limitarse a, DOTA, BAD, TETA, DTPA, EDTA, NTA, HDTA, sus análogos de fosfonato y mezclas de los mismos. Un experto en la técnica estará familiarizado con los métodos para unir radionúclidos, agentes quelantes y enlazadores de agentes quelantes a las partículas.

También están disponibles monómeros de marcadores no radiactivos y no fluorescentes. Por ejemplo, la biotina se puede unir directamente a los nucleótidos y detectarse mediante la unión específica y de alta afinidad a avidina o estreptavidina que se ha acoplado químicamente a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica (tal como fosfatasa, luciferasa o peroxidasa). Los nucleótidos marcados con digoxigenina también se pueden usar de manera similar para la detección no isotópica de ácidos nucleicos. Los nucleótidos biotinilados y marcados con digoxigenina están disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones, la reacción enzimática sobre un sustrato se puede utilizar como método de detección. En tales realizaciones, las enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) se pueden unir a un nucleótido de una sonda marcadora y/o decodificadora de ácido nucleico. Durante la detección, se puede agregar un sustrato sobre el cual reacciona la enzima particular para inducir una reacción colorimétrica. Cualquier reacción enzima-sustrato conocida en la técnica puede usarse en este documento.

Las partículas muy pequeñas, denominadas nanopartículas, también se pueden usar como marcadores detectables o moléculas detectables para marcar sondas decodificadoras o cualquier ácido nucleico. Estas partículas varían en tamaño entre 1 y 1,000 nm e incluyen diversas estructuras químicas, como partículas de oro y plata y puntos cuánticos.

Cuando se irradian con luz blanca incidente en ángulo, las nanopartículas de plata u oro que oscilan entre 40 y 120 nm dispersarán la luz monocromática con alta intensidad. La longitud de onda de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula. De cuatro a cinco partículas diferentes en estrecha proximidad, cada una dispersará luz monocromática que, cuando se superponga, dará un color específico y único. Alternativamente, las nanopartículas de oro pueden detectarse o "revelarse" utilizando un revelador a base de plata de modo que la diminuta nanopartícula pueda detectarse fácilmente, incluso a simple vista. Las partículas están siendo fabricadas por empresas como Genicon Sciences. Las partículas de oro o plata derivatizadas se pueden unir generalmente a una amplia gama de moléculas moleculares que incluyen proteínas, anticuerpos, moléculas pequeñas, ligandos de receptores y ácidos nucleicos. Por ejemplo, la superficie de la partícula se puede derivatizar químicamente para permitir la unión a un nucleótido, que luego se puede incorporar a una sonda decodificadora.

Otro tipo de nanopartícula que se puede utilizar como molécula detectable o marcador detectable son los puntos cuánticos. Los puntos cuánticos son cristales fluorescentes de 1 a 5 nm de diámetro que son excitables por una amplia gama de longitudes de onda de luz. Estos cristales emiten luz, como la luz monocromática, con una longitud de onda que depende de su composición química y tamaño. Los puntos cuánticos tales como CdSe , ZnSe , InP o InAs poseen propiedades ópticas únicas.

Debido a su tamaño muy pequeño, los puntos cuánticos generalmente se pueden acoplar en oligonucleótidos directamente sin afectar la solubilidad o el uso del oligonucleótido. Por lo tanto, los puntos cuánticos se pueden acoplar a sondas decodificadoras como se describe en este documento. Para sintetizar un complejo de sonda decodificadora-punto cuántico mediante química convencional por lotes, tanto la sonda decodificadora como el punto cuántico requieren al menos un grupo reactivo de diferentes tipos que puedan reaccionar entre sí. Por ejemplo, si una sonda decodificadora tiene un grupo amino y un punto cuántico tiene un grupo aldehído, estos grupos pueden reaccionar para formar una base de Schiff. Se puede derivatizar una sonda decodificadora para unir un único grupo amino u otro grupo funcional usando química bien conocida en la técnica. Cuando se derivatiza un punto cuántico, el punto cuántico se puede cubrir con un reactivo químico que recubre toda la superficie de la nanopartícula con varios grupos funcionales.

Se puede unir una molécula detectable o un marcador detectable a un nucleótido de una sonda decodificadora o ácido nucleico usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. Por ejemplo, la molécula detectable o el marcador detectable se pueden unir directamente al nucleótido en una correspondencia 1:1 mediante la incorporación de un fosfato radiactivo en la cadena de fosfato del nucleótido. Además, por ejemplo, se ha informado de un método general para marcar fosfatos con un marcador fluorescente que emplea un derivado de imidazol preparado a partir de una hidrazida BODIPY FL (Wang y Giese, Anal. Chem. 65: 3518 (1993)).

Dependiendo de la fracción de marcación utilizada, puede ser deseable derivatizar o modificar químicamente un nucleótido para unir el monómero marcador. Estos métodos y químicas son conocidos en la técnica. Además, se puede usar un enlazador para unir una molécula detectable o un marcador detectable a un nucleótido en una correspondencia 1:1. Por ejemplo, un nucleótido marcado con fluorescencia como la fluoresceína-12-dUTP puede tener un monómero fluoróforo unido mediante un grupo aminoalquilino de cuatro átomos a la molécula de dUTP.

Estos nucleótidos unidos a moléculas detectables o marcadores detectables pueden incorporarse en una sonda decodificadora o ácido nucleico usando varios métodos para marcar ácidos nucleicos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse enzimas tales como polimerasas de ADN o ARN, polimerasas Taq, desoxinucleotidil transferasas terminales o transcriptasas inversas para incorporar nucleótidos marcados en sondas decodificadoras o ácidos nucleicos.

Los nucleótidos marcados pueden incorporarse en secuencias de sonda decodificadora o ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante traducción de muescas. En este procedimiento, la ADNasa I se usa para crear mellas de una sola hebra en el ADN de doble hebra y luego las acciones de exonucleasa de 5' a 3' y de polimerasa de 5' a 3' de la ADN polimerasa I de *E. coli* se usan para eliminar tramos de ADN de una sola hebra a partir de las muescas y reemplazarlos con nuevas hebras hechas mediante la incorporación de nucleótidos marcados. La traducción de Nick puede utilizar cualquier nucleótido marcado, incluidos los nucleótidos marcados radiactivamente y los nucleótidos biotinilados o marcados con digoxigenina. De manera similar, la ADN polimerasa T4 se puede utilizar para incorporar nucleótidos marcados. Además, los nucleótidos marcados se pueden incorporar a los ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las polimerasas Taq. El grado de marcación puede controlarse incluyendo uno o hasta los cuatro nucleótidos marcados. Además, el grado de marcación puede controlarse aumentando o disminuyendo la concentración del nucleótido o nucleótidos marcados.

Otros métodos para marcación de sondas decodificadoras o ácidos nucleicos incluyen la generación de ADNc de cadena sencilla a partir de ARN utilizando una transcriptasa inversa en presencia de nucleótidos marcados. Además, el ADN se puede clonar en un vector con sitios de polimerasa SP6 o T7. La transcripción en presencia de ARN polimerasa SP6 o T7 y nucleótidos marcados da como resultado un transcrito de ARN marcado. El transcrito se puede marcar en diferentes grados incluyendo uno o más nucleótidos marcados. Además, se pueden marcar varios nucleótidos dentro de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante la clonación de ADN en un vector basado en el bacteriófago M13. Luego, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y el cebador de la sonda universal M13 se pueden usar para sintetizar la base complementaria con la incorporación de nucleótidos marcados.

Anteriormente se describieron varios métodos para la incorporación de nucleótidos marcados en sondas decodificadoras o ácidos nucleicos recién sintetizados. Los ácidos nucleicos existentes también se pueden marcar utilizando varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARN o el ADN se pueden marcar en el extremo con [γ -³²P]ATP y polinucleótido quinasa T4. Esta quinasa se puede usar para transferir el fosfato radiactivo de ATP a un grupo OH 5' libre en ADN o ARN. La enzima también tiene actividad de fosfatasa, por lo que son posibles dos reacciones. En la reacción directa, la enzima cataliza la fosforilación que sigue a la eliminación de los fosfatos del terminal 5' con fosfatasa alcalina (u otra fosfatasa). En la reacción de intercambio, la quinasa cataliza el intercambio de un fosfato 5' existente con el tercero o γ fosfato de ATP. La última reacción se lleva a cabo en presencia de exceso de ATP y ADP para una fosforilación eficiente. Con este método, el fosfato radiactivo de ATP se transfiere al final de la molécula de ácido nucleico.

Las sondas decodificadoras o los ácidos nucleicos también se pueden marcar con desoxinucleotidil transferasa terminal que añade nucleótidos marcados en el extremo 3' de los fragmentos de ADN. Tanto los ADN de cadena sencilla como los de cadena doble son sustratos de esta enzima. El fragmento grande (Klenow) de la ADN polimerasa I de *E. coli* también se puede utilizar para marcar los extremos de las sondas decodificadoras o los ácidos nucleicos. Dado que esta enzima tiene una actividad de polimerasa de 5' a 3', se puede usar para "rellenar" los extremos 3' de los fragmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) opuestos a las extensiones o salientes 5' con nucleótidos marcados. El marcado final de sondas decodificadoras o ácidos nucleicos usando polinucleótido quinasa o desoxinucleotidil transferasa terminal da como resultado la incorporación de un marcador detectable o molécula detectable por ácido nucleico. La reacción de "rellenar" se puede usar para marcar la sonda decodificadora o el ácido nucleico en un nucleótido por ácido nucleico o en más de un nucleótido por ácido nucleico.

Además, las sondas decodificadoras o los ácidos nucleicos pueden marcarse mediante la modificación de nucleótidos dentro de las secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los residuos de citidina en el ADN y el ARN pueden modificarse por reacción con bisulfito de sodio para formar intermediarios de sulfonato que luego pueden acoplarse directamente a hidrazidas o aminas alifáticas. Prácticamente cualquiera de las fluorescentes, biotina u otras hidrazidas o aminas alifáticas puede usarse en esta reacción. El ácido citidílico activado con bisulfito también se puede acoplar

a diaminas alifáticas tales como etilendiamina. Los ácidos nucleicos modificados con amina (p. ej., ADN o ARN) pueden modificarse luego con cualquiera de los colorantes reactivos con amina. Además, los grupos fosfato pueden ser el objetivo de los ácidos nucleicos para su marcaje. Aunque los grupos fosfato de nucleótidos no son muy reactivos en solución acuosa, sus grupos fosfato terminales pueden reaccionar con carbodiimidas y reactivos similares en combinación con nucleófilos para producir fosfodiésteres, fosforamidatos y fosforotioatos marcados. Por ejemplo, los ácidos nucleicos (p. ej., ADN) se pueden hacer reaccionar cuantitativamente con carbonildiimidazol y una diamina tal como etilendiamina para producir un fosforamidato que tiene una amina primaria libre y esta amina se puede modificar luego con reactivos que reaccionan con amino. Se han acoplado aminas fluorescentes o biotiniladas al fosfato 5' del ARNt usando ditiodipiridina y trifenilfosfina.

El enlace entre moléculas detectables o marcadores detectables y sondas decodificadoras o ácidos nucleicos pueden ser enlaces covalentes o enlaces no covalentes que son estables a la hibridación. Las moléculas detectables o los marcadores detectables se pueden unir a una sonda decodificadora o a un ácido nucleico de una manera específica de secuencia, por ejemplo mediante la incorporación de un nucleótido marcado en una secuencia que ha sido digerida por una enzima de restricción. Alternativamente, las moléculas detectables o los marcadores detectables se pueden unir a una sonda decodificadora o un ácido nucleico de una manera no específica de secuencia, por ejemplo mediante la incorporación de un marcador en el fosfato terminal de un ácido nucleico usando [γ - ^{32} P]ATP y polinucleótido quinasa T4.

Síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo, para al menos parte del marcador de ácido nucleico, tal como subsecuencias predeterminadas y/o secuencias de sonda decodificadora

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden sintetizar químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de diversas formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre la región de unión del marcador y las secuencias o segmentos de polinucleótidos complementarios reconocidos, por ejemplo, se pueden usar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar el ácido nucleico sintético incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

Alternativamente, el ácido nucleico sintético se puede producir biológicamente utilizando un vector en el que se ha subclonado un ácido nucleico. Como un ejemplo, se puede elaborar una cadena de ADN de cadena sencilla lineal a partir de un ADN de plásmido de cadena doble usando un protocolo de cuatro etapas que incluye (i) linealización del ADNbc con una enzima de restricción, (ii) desfosforilación con una fosfatasa termolábil, (iii) digestión con una segunda enzima de restricción para separar el vector de clonación de la secuencia de la cadena principal y (iv) digestión con una digestión con exonucleasa lambda específica de la cadena, dejando intacta solo una cadena del fragmento de la cadena principal.

En diversas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden modificarse en fracción base, la fracción de azúcar o la cadena principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación o la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la cadena principal de fosfato de desoxirribosa de los ácidos nucleicos se puede modificar para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup et al., 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 40: 5-23). Como se usa en el presente documento, los términos "ácidos nucleicos peptídicos" o "PNA" se refieren a miméticos de ácido nucleico, por ejemplo, miméticos de ADN, en los que la cadena principal de fosfato de desoxirribosa se reemplaza por una cadena principal pseudopeptídica y solo se retienen las cuatro bases nitrogenadas naturales. Se ha demostrado que la cadena principal neutral de los PNA permite la hibridación específica con el ADN y el ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA se puede realizar utilizando protocolos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en Hyrup et al., 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23; Perry-O'Keefe et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93: 14670-675.

En un ejemplo de realización, la nueva secuencia de ácido nucleico seleccionada (p. ej., la secuencia de ADN) puede construirse sintéticamente como ácido nucleico de doble cadena por una empresa comercial de síntesis de genes y clonarse de forma orientada en un "fagémido", un vector plasmídico que contiene una región intergénica (IG) del fago M13 o f1 que contiene las secuencias que actúan en cis necesarias para la replicación del ácido nucleico (p. ej., ADN) y la encapsidación del fago, tal como pUC119. La orientación adecuada del inserto clonado en relación con el origen de replicación del fago permite la generación de una cadena principal de ADN de cadena sencilla que es el complemento inverso de las moléculas de ARN generadas por transcripción *in vitro* para cada región de unión al marcador.

Para generar la cadena de ácido nucleico de cadena sencilla (p. ej., ADN) (p. ej., de al menos parte de las sondas marcadoras y/o decodificadoras de ácido nucleico), el fagémido se transforma en una cepa de *E. coli* que contiene un episoma F'. La infección posterior de las bacterias transformadas con un fago auxiliar como el mutante M113 K07 da como resultado la secreción del fagémido que porta la secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla, fago empaquetado a partir del cual se prepara el ácido nucleico de cadena sencilla circular utilizando un protocolo estándar. Este ácido nucleico se linealiza y la porción del vector se corta hibridando oligonucleótidos complementarios cortos con cualquier extremo de la secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla para generar sitios de restricción de cadena doble, seguido de tratamiento con las enzimas de restricción apropiadas.

Analitos o moléculas objetivo

Los términos "analito", "analito objetivo" y "molécula objetivo", tal como se usan de manera intercambiable en este documento, se refieren a la molécula detectada, identificada o medida mediante la unión de un reactivo de detección descrito en este documento cuyo reactivo o reactivos de sonda reconocen (es decir, son compañeros de unión específicos) a la misma. En algunas realizaciones, una molécula objetivo o un analito puede ser, pero sin limitarse a, cualquiera de los siguientes o cualquier combinación de los siguientes: ácido nucleico, péptido, un polipéptido/proteína (por ejemplo, una proteína bacteriana o viral o un anticuerpo), un lípido, un carbohidrato, una glicoproteína, un glicolípido, una molécula pequeña, un monómero orgánico, azúcar, peptidoglicano, una célula, un virus o un fármaco. Los ácidos nucleicos que pueden analizarse mediante los métodos del presente documento incluyen: ADN de cadena doble, ADN de cadena sencilla, horquillas de ADN de cadena sencilla, híbridos de ADN/ARN, ARN (por ejemplo, ARNm o miARN) y horquillas de ARN. Generalmente, una molécula objetivo puede ser una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc. En otras realizaciones, una molécula objetivo puede modificarse, por ejemplo, mediante mutación o reacción química. En algunas realizaciones, una molécula objetivo puede ser sintética o recombinante.

En algunas realizaciones, un analito puede ser un analito que comprende al menos una modificación postraduccional, por ejemplo, fosforilaciones y/o glicosilaciones.

Una molécula objetivo o un analito puede ser parte de una muestra que contiene otros componentes o puede ser el componente único o principal de la muestra. Una molécula objetivo o un analito puede ser un componente de una célula completa, tejido o fluido corporal, un extracto de célula o tejido, un lisado fraccionado del mismo o una molécula sustancialmente purificada. La molécula objetivo puede estar presente en solución o unida a un sustrato sólido, que incluye, por ejemplo, una superficie sólida tal como un chip, una micromatriz, una perla o una membrana de transferencia. Además, la molécula o analito objetivo puede tener una estructura o secuencia conocida o desconocida.

Muestra

Los métodos, reactivos de detección y kits descritos en este documento se pueden usar para analizar una muestra de cualquier fuente, por ejemplo, pero sin limitarse a, muestras biológicas (por ejemplo, recolectadas de organismos, animales o sujetos), muestras ambientales, alimentos, subproductos alimentarios, suelo, muestras arqueológicas, muestras extraterrestres o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el término "muestra" se refiere a una muestra biológica. El término "muestra biológica", como se usa en el presente documento, indica una muestra tomada o aislada de un organismo biológico, por ejemplo, sobrenadante de cultivo de células de tejido, lisado celular, una muestra de tejido (por ejemplo, biopsia), un homogeneizado de una muestra de tejido de un sujeto o una muestra de fluido de un sujeto. Ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, esputo, orina, fluido cerebroespinal, orina, sudor, mucosidad, flujo nasal, fluidos vaginales, líquido espinal, fluido pleural, aspirados de pezones, líquido linfático, secciones externas de la piel, vías respiratorias, intestinales y tractos genitourinarios, lágrimas, saliva, leche, heces, esperma, células o cultivos celulares, suero, fracciones de leucocitos, frotis, muestras de tejido de todo tipo, plantas y partes de plantas, microorganismos (tal como bacterias), virus (tal como citomegalovirus, VIH, hepatitis B, hepatitis C, virus de la hepatitis δ), levaduras, embriones, hongos, material de muestra libre de células, etc. El término también incluye una mezcla de las muestras mencionadas anteriormente, como plantas infectadas con hongos o sangre humana entera que contiene micobacterias, así como muestras de alimentos que contienen ácidos nucleicos libres o unidos, o proteínas, o células que contienen ácidos nucleicos o proteínas, muestras ambientales que contienen ácidos nucleicos libres o unidos, o proteínas, o células que contienen ácidos nucleicos o proteínas. El término "muestra biológica" también incluye muestras biológicas no tratadas o pretratadas (o procesadas previamente).

Una "muestra biológica" puede contener células del sujeto, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, como fracciones no celulares de sangre, saliva u orina, que se pueden usar para medir los niveles de expresión génica. En algunas realizaciones, la muestra es de una resección, biopsia broncoscópica o biopsia con aguja gruesa de un tumor primario o metastásico, o un bloque celular de líquido pleural. Además, se pueden usar muestras de aspirado con aguja fina. Las muestras pueden ser tejido incluido en parafina o congelado. En algunas realizaciones, una muestra biológica puede comprender una biopsia, un tejido extraído quirúrgicamente, una transferencia o cualquier combinación de los mismos.

La muestra se puede obtener extrayendo una muestra de células de un sujeto, pero también se puede lograr usando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona). Además, la muestra biológica puede ser recién recolectada o una muestra previamente recolectada. Además, la muestra biológica puede utilizarse para la detección de la presencia y/o el nivel cuantitativo de una biomolécula de interés. Los analitos objetivo representativos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, proteínas y derivados y fragmentos de los mismos.

En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra biológica no tratada. Tal como se usa en el presente documento, la frase "muestra biológica no tratada" se refiere a una muestra biológica que no ha tenido ningún tratamiento previo de la muestra excepto por dilución y/o suspensión en una solución. Los ejemplos de métodos para tratar una muestra biológica incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, sonicación, homogeneización, calentamiento, congelación y descongelación, y cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con algunas realizaciones, una muestra biológica se puede procesar previamente, como se describió anteriormente, antes de emplear los reactivos de detección y los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, la muestra biológica se puede filtrar antes de aislar un material celular de acuerdo con los métodos, aparatos y kits descritos en este documento.

En algunas realizaciones, la muestra biológica puede tratarse con un reactivo químico y/o biológico. Se pueden emplear reactivos químicos y/o biológicos para proteger y/o mantener la estabilidad de la muestra o los analitos objetivo durante el procesamiento. Además, o alternativamente, se pueden emplear reactivos químicos y/o biológicos para liberar o exponer los analitos objetivo de otros componentes de la muestra. Un ejemplo de reactivo es un inhibidor de proteasa, que generalmente se usa para proteger o mantener la estabilidad de los analitos objetivo durante el procesamiento.

En algunas realizaciones, el término "muestra" como se usa en el presente documento puede referirse a una muestra ambiental (que incluye, pero sin limitarse a, muestras de aire, agrícolas (p. ej., pero sin limitarse a granjas de hidropónicas o muestras hidropónicas), estanques, agua, aguas residuales y suelo); muestras de agentes de guerra biológica; muestras de investigación, incluidos los fluidos extracelulares. En algunas realizaciones, una muestra ambiental puede comprender una muestra recolectada de una superficie de trabajo de un equipo o máquina (p. ej., pero no limitado a, equipo o máquina de procesamiento de productos alimenticios o farmacéuticos), un dispositivo (p. ej., pero no limitado a, dispositivos biomédicos, dispositivos de implantación, dispositivos de administración de fluidos tal como un tubo y/o un catéter) y/o un edificio o viviendas (p. ej., pero no limitado a, plantas de procesamiento de alimentos, plantas de fabricación farmacéutica, hospitales y/o clínicas).

En algunas realizaciones, una muestra puede comprender alimentos (p. ej., alimentos sólidos y/o fluidos, así como alimentos procesados) y/o subproductos alimentarios. Por ejemplo, los métodos, reactivos de detección y kits descritos en este documento se pueden usar para detectar un analito, por ejemplo, un nutriente particular, en alimentos y/o subproductos alimentarios, por ejemplo, pero sin limitarse a, carne, leche, yogur, pan, productos a base de almidón, verduras y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los métodos, reactivos de detección y kits descritos en el presente documento pueden usarse para detectar un contaminante, por ejemplo, bacterias, hongos, esporas, mohos y/o virus, en alimentos y/o subproductos alimentarios.

En algunas realizaciones, una muestra puede comprender un producto farmacéutico (p. ej., pero sin limitarse a, píldoras, tabletas, cápsulas de gel, jarabes, vacunas, líquidos, aerosoles y cualquier combinación de los mismos). Por ejemplo, los métodos, los reactivos de detección y los kits descritos en este documento se pueden usar para detectar la presencia y/o medir el nivel de un agente activo particular presente en un producto farmacéutico. En algunas realizaciones, los métodos, reactivos de detección y kits descritos en el presente documento pueden usarse para detectar un contaminante, por ejemplo, bacterias, hongos, esporas, mohos y/o virus, en un producto farmacéutico.

En algunas realizaciones, una muestra puede comprender una muestra arqueológica. En algunas realizaciones, se puede obtener o recolectar una muestra arqueológica de artefactos, arquitectura, biofactos (o ecofactos, por ejemplo, un objeto encontrado en un sitio arqueológico), paisajes culturales y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, una muestra puede comprender una muestra extraterrestre. Por ejemplo, una muestra extraterrestre puede ser cualquier objeto o espécimen (p. ej., roca, meteorito y/o muestras ambientales) obtenido o recolectado del espacio exterior o del universo, y/o planetas más allá del planeta Tierra, p. ej., la luna, otros planetas (p. ej., pero no limitado a, Marte y/o Júpiter) y/u objetos no estelares.

Aplicaciones de los reactivos de detección

Los reactivos de detección, las composiciones, los métodos y los kits descritos en el presente documento se pueden usar con fines diagnósticos, terapéuticos de pronóstico y de detección. Proporcionan la ventaja de que se pueden analizar muchos analitos objetivo diferentes al mismo tiempo a partir de una sola muestra utilizando los métodos descritos en este documento. Esto permite, por ejemplo, que se realicen varias pruebas de diagnóstico en una muestra.

Cuando el reactivo de sonda es un ácido nucleico, los métodos descritos en este documento pueden discriminar entre secuencias de nucleótidos. La diferencia entre las secuencias de nucleótidos objetivo puede ser, por ejemplo, una única diferencia de base de ácido nucleico, una eliminación de ácido nucleico, una inserción de ácido nucleico o un

reordenamiento. Tales diferencias de secuencia que implican más de una base también pueden detectarse. En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas de oligonucleótidos tienen sustancialmente la misma longitud, de modo que hibridan con secuencias de nucleótidos objetivo en condiciones de hibridación sustancialmente similares. Como resultado, el proceso descrito en el presente documento es capaz de detectar varios tipos de enfermedades o trastornos, por ejemplo, pero sin limitarse a, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas y cáncer.

Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría en particular, los reactivos de detección, las composiciones, los métodos y los kits descritos en el presente documento también se pueden usar para el control ambiental, la ciencia forense y la ciencia de los alimentos. Los ejemplos de análisis genéticos que se pueden realizar en ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, detección de SNP, detección de STR, análisis de expresión de ARN, metilación de promotores, expresión génica, detección de virus, subtipificación viral y resistencia a fármacos.

En el área de monitoreo ambiental, algunas realizaciones pueden usarse para la detección, identificación y monitoreo de microorganismos patógenos e indígenas en ecosistemas y microcosmos naturales y modificados tales como en sistemas de purificación de aguas residuales municipales y depósitos de agua o en áreas contaminadas sometidas a biorremediación. También se puede usar para detectar plásmidos que contienen genes que pueden metabolizar xenobióticos, para monitorear microorganismos objetivo específicos en estudios de dinámica de poblaciones, o para detectar, identificar o monitorear microorganismos genéticamente modificados en el medio ambiente y en plantas industriales.

Algunas realizaciones también se pueden usar en una variedad de áreas forenses, incluida la identificación humana para personal militar e investigación criminal, pruebas de paternidad y análisis de relaciones familiares, tipificación de compatibilidad de HLA y análisis de sangre, espermatozoides u órganos de trasplante para detectar contaminación.

En la industria de alimentos y piensos, algunas realizaciones tienen una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, se puede utilizar para la identificación y caracterización de organismos de producción como la levadura para la producción de cerveza, vino, queso, yogur, pan, etc. Otra área de uso está relacionada con el control de calidad y la certificación de productos y procesos (p. ej., ganadería, pasteurización y procesamiento de carne) para detectar contaminantes. Otros usos incluyen la caracterización de plantas, bulbos y semillas con fines de reproducción, la identificación de la presencia de patógenos específicos de plantas y la detección e identificación de infecciones veterinarias.

En algunas realizaciones, los métodos, reactivos de detección y kits descritos en el presente documento se pueden usar para detectar la presencia y/o medir el nivel de un agente activo particular presente en un producto farmacéutico. En algunas realizaciones, los métodos, reactivos de detección y kits descritos en el presente documento pueden usarse para detectar un contaminante, por ejemplo, bacterias, hongos, esporas, mohos y/o virus, en un producto farmacéutico.

En algunas realizaciones, los métodos, reactivos de detección y kits descritos en este documento pueden usarse para detectar la presencia y/o medir el nivel de un analito de interés presente en una muestra arqueológica, por ejemplo, obtenida o recolectada de artefactos, arquitectura, biofactos (o ecofactos, por ejemplo, un objeto encontrado en un sitio arqueológico), paisajes culturales y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los métodos, reactivos de detección y kits descritos en este documento se pueden usar para detectar la presencia y/o medir el nivel de un analito de interés presente en una muestra extraterrestre, por ejemplo, cualquier objeto o espécimen (por ejemplo, roca, meteorito y/o muestras ambientales) obtenido o recolectado del espacio exterior o universo, y/o planetas más allá del planeta Tierra, por ejemplo, la luna, otros planetas (por ejemplo, pero no limitado a, Marte y/o Júpiter) y/u objetos no estelares. Por ejemplo, los métodos, los reactivos de detección y los kits descritos en este documento se pueden usar para analizar la composición de una muestra o espécimen extraterrestre, por ejemplo, una muestra de roca, una muestra de agua y/o una muestra de aire.

En algunas realizaciones, los reactivos de detección y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para detectar y/o identificar analitos que comprenden una modificación postraducciona, por ejemplo, fosforilación o glicosilación. Como tal, en algunas realizaciones, los reactivos de detección y los métodos descritos en el presente documento pueden diferenciar entre múltiples formas de glicosilación diferentes de proteínas terapéuticas recombinantes.

Inmunohistoquímica: Algunas realizaciones se pueden usar para realizar la tinción basada en anticuerpos de células o tejidos para evaluación microscópica. Esto puede implicar muestras no fijadas o no permeabilizadas examinadas en busca de antígenos de superficie o extracelulares, o muestras permeabilizadas en las que también se prueban antígenos intracelulares. Si bien es muy común, la inmunohistoquímica generalmente se limita a sondear con un pequeño conjunto de anticuerpos a la vez (debido a la limitación de los colores ópticos disponibles), y generalmente se evitan múltiples ciclos de tinción, ya que la eliminación de los anticuerpos del ciclo anterior puede dañar la muestra. Algunas realizaciones de los reactivos de detección que comprenden anticuerpos como reactivos de sonda y marcadores de ácido nucleico pueden permitir el uso simultáneo de muchos anticuerpos, lo que ahorra tiempo y material de muestra, extrae más datos y exige menos conocimiento previo de la muestra. En algunas realizaciones, sin pretender estar ligado a la teoría, cuando un subconjunto de los antígenos sondeados puede superponerse

espacialmente, pueden usarse los reactivos de detección con una pluralidad de subsecuencias predeterminadas contiguas (p. ej., cada subsecuencia predeterminada contiene un nucleótido, como se muestra en la Figura 1).

Hibridación *in situ*: La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) es una técnica para detectar (y/o cuantificar) la presencia de cierto ADN o ARN celular (a menudo ARN ribosómico). Al igual que con otras técnicas basadas en fluorescencia, FISH se limita a la cantidad de colores disponibles para la microscopía. Usando algunas realizaciones de los reactivos de detección y/o métodos descritos en este documento, las células pueden ser analizadas para muchas secuencias simultáneamente, lo que permite al usuario ahorrar tiempo y material de muestra, extraer más datos y exigir menos conocimiento previo de la muestra.

Perfilado de expresión: Los reactivos de sonda de ácido nucleico de los reactivos de detección pueden apuntar al ARN mensajero o al microARN y proporcionar información sobre el estado de expresión a nivel de ARN de la célula. Usando algunas realizaciones de los reactivos de detección y/o métodos descritos en este documento, el ensayo puede capturar y sondear numerosos ARNm y/o miARN a la vez, reduciendo y/o eliminando las etapas de extracción potencialmente dañinas.

Transferencias Western: Las transferencias Western son ensayos de proteínas en los que las proteínas se separan electroforéticamente, se transfieren a una membrana y se tiñen. En muchos casos, la tinción se realiza utilizando uno o varios anticuerpos para detectar los antígenos correspondientes en la transferencia. Mediante el uso de algunas realizaciones de los reactivos de detección y/o métodos descritos en el presente documento, la transferencia se puede sondear simultáneamente utilizando un gran número de anticuerpos sin etapas de extracción de anticuerpos. Esto puede permitir que una transferencia brinde significativamente más información que las transferencias Western convencionales en las que generalmente se prueba un anticuerpo a la vez y puede requerir la extracción de anticuerpos para la siguiente prueba de anticuerpos, lo que ahorra tiempo y material de muestra.

Métodos de diagnóstico/pronóstico: Los presentes métodos se pueden aplicar al análisis de muestras biológicas obtenidas o derivadas de un paciente para determinar si un tipo de célula enferma está presente en la muestra y/o para determinar el estadio de la enfermedad.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se usan en el diagnóstico de una afección. Como se usa en el presente documento, el término "diagnosticar" o "diagnóstico" de una afección incluye predecir o diagnosticar la afección, determinar la predisposición a la afección, monitorear el tratamiento de la afección, diagnosticar una respuesta terapéutica de la enfermedad y el pronóstico de la afección, la progresión de la afección y la respuesta a un tratamiento particular de la afección. Por ejemplo, se puede analizar una muestra de sangre de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para determinar la presencia y/o la cantidad de marcadores de un tipo de célula cancerosa en la muestra, diagnosticando o estadificando así el cáncer.

En algunas realizaciones, los reactivos de detección y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse directamente como agentes de contraste para el diagnóstico *in vivo* o *in situ*, en el que los reactivos de detección se administran a un sujeto, ya sea por administración oral o inyección local. Los reactivos de sonda de los reactivos de detección pueden unirse a los analitos objetivo, por ejemplo, biomarcadores para enfermedades o trastornos específicos, y la detección de los marcadores de ácido nucleico utilizando los métodos descritos en este documento pueden entonces localizar los analitos objetivo. En algunas realizaciones, los reactivos de detección y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para localizar tumores microscópicos en un sujeto, donde otros métodos convencionales no son lo suficientemente sensibles para detectar tales tumores microscópicos.

Los cánceres que pueden detectarse mediante algunas realizaciones del proceso descrito en el presente documento implican generalmente oncogenes, genes supresores de tumores o genes implicados en la amplificación, replicación, recombinación o reparación del ADN. Ejemplos de estos incluyen: Gen BRCA1, gen p53, gen APC, amplificación de Her2/Neu, Bcr/Ab1, gen K-ras y virus del papiloma humano tipos 16 y 18. Algunas realizaciones se pueden usar para identificar amplificaciones, eliminaciones grandes así como mutaciones puntuales y eliminaciones/inserciones pequeñas de los genes anteriores en los siguientes cánceres humanos comunes: leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, tumores cerebrales, tumores del sistema nervioso central, tumores de vejiga, melanomas, cáncer de hígado, osteosarcoma y otros cánceres óseos, carcinomas testiculares y de ovario, tumores de cabeza y cuello y neoplasias cervicales.

Las enfermedades genéticas también pueden detectarse mediante algunas realizaciones del proceso descrito en el presente documento. Esto puede llevarse a cabo mediante cribado prenatal o posnatal de aberraciones cromosómicas y genéticas o de enfermedades genéticas. Los ejemplos de enfermedades genéticas detectables incluyen: deficiencia de 21-hidroxilasa, fibrosis quística, síndrome de X frágil, síndrome de Turner, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de Down u otras trisomías, enfermedades cardíacas, enfermedades de genes individuales, tipificación de HLA, fenilcetonuria, anemia de células falciformes, enfermedad de Tay-Sachs, talasemia, síndrome de Klinefelter, enfermedad de Huntington, enfermedades autoinmunes, lipodosis, defectos de obesidad, hemofilia, errores congénitos del metabolismo y diabetes.

Alternativamente, los métodos descritos en este documento pueden usarse para diagnosticar infecciones por patógenos, por ejemplo, infecciones por virus y bacterias intracelulares, determinando la presencia y/o cantidad de marcadores de bacterias o virus, respectivamente, en la muestra.

- 5 Se puede detectar una amplia variedad de enfermedades infecciosas mediante algunas realizaciones del proceso descrito en el presente documento. Por lo general, estos son causados por agentes infecciosos bacterianos, virales, parásitos y hongos. La resistencia de diversos agentes infecciosos a los fármacos también se puede determinar usando algunas realizaciones descritas en el presente documento.

10 Los agentes infecciosos bacterianos que pueden detectarse mediante algunas realizaciones pueden incluir *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium aviumintracellulare*, *Yersinia*, *Francisella*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Clostridia*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus hemolítico B*, *Corynebacteria*, *Legionella*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Hemophilus influenza*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, patógenos de *Rickettsia*, *Nocardia* y *Actinomicetos*.

15 Los agentes infecciosos fúngicos que pueden detectarse mediante algunas realizaciones pueden incluir *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Phycomycetes (Rhizopus)*, *Sporothrix schenckii*, *Chromomycosis* y *Maduromycosis*.

20 Los agentes infecciosos virales que pueden detectarse mediante algunas realizaciones pueden incluir virus de la inmunodeficiencia humana, virus linfocitotrófico de células T humanas, virus de la hepatitis (p. ej., virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C), virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus del papiloma humano, ortomixovirus, paramixovirus, adenovirus, coronavirus, rabdovirus, virus de la poliomielitis, togavirus, bunyavirus, arenavirus, virus de la rubéola y reovirus.

25 Los agentes parasitarios que pueden detectarse mediante algunas realizaciones pueden incluir *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania*, *Trypanosoma* spp., *Schistosoma* spp., *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium*, *Giardia* spp., *Trichomonas* spp., *Balantidium coli*, *Wuchereria bancrofti*, *Toxoplasma* spp., *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Dracunculus medinensis*, *Trematodos*, *Diphyllobothrium latum*, *Taenia* spp., *Pneumocystis carinii* y *Necator americanus*.

30 En algunas realizaciones, se puede usar el contacto de una muestra biológica con los reactivos de detección descritos en el presente documento, inmunotinción, hibridación *in situ* o una combinación, con el fin de detectar e identificar patógenos en muestras biológicas. En tales realizaciones, por ejemplo, los antígenos de superficie o intracelulares, el ADN, el ARN ribosómico y/o el ARN mensajero pueden detectarse con algunas realizaciones de los reactivos de detección y los métodos descritos en el presente documento. Los reactivos de detección y los métodos descritos en este documento pueden ser especialmente útiles en este contexto ya que a) no se sabe de antemano qué patógeno puede haber en la muestra, y b) cada célula patógena debe responder a una o algunas de las sondas, lo que facilita el diseño del reactivo de detección y del marcador de ácido nucleico.

40 Algunas realizaciones también se pueden usar para la detección de resistencia a fármacos por parte de agentes infecciosos. Por ejemplo, *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos y virus de inmunodeficiencia humana resistente a AZT pueden identificarse con algunas realizaciones descritas en este documento.

45 Por lo tanto, las moléculas objetivo detectadas usando las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden ser marcadores de pacientes (tal como un marcador de cáncer) o marcadores de infección con un agente extraño, tal como marcadores bacterianos o virales.

Debido a la naturaleza cuantitativa de los reactivos de detección, las composiciones y los métodos descritos en este documento se pueden usar para cuantificar moléculas objetivo cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o enfermedad, por ejemplo, marcadores sanguíneos que están sobrerregulados o subregulados como resultado de un estado de enfermedad.

50 Además, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para proporcionar información de pronóstico que ayude a determinar un curso de tratamiento para un paciente. Por ejemplo, la cantidad de un marcador particular para un tumor se puede cuantificar con precisión incluso a partir de una pequeña muestra de un paciente. Para ciertas enfermedades como el cáncer de mama, la sobreexpresión de ciertos genes, como Her2-neu, indica que se necesitará un curso de tratamiento más agresivo.

55 En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se pueden administrar a un sujeto para el diagnóstico y/o seguimiento *in vivo* de una enfermedad o trastorno. Los dispositivos o métodos específicos conocidos en la técnica para la detección *in vivo* de fluorescencia, por ejemplo, de fluoróforos o proteínas

fluorescentes, incluyen, pero no se limitan a, fluorescencia infrarroja cercana *in vivo* (véase, por ejemplo, Frangioni, Curr. Opin. Chem. Biol. 7: 626-634 (2003)), el sistema de imágenes de fluorescencia *in vivo* Maestro^{MC} (Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, Mass.), imágenes de fluorescencia *in vivo* usando un escáner de puntos voladores (véase, por ejemplo, Ramanujam et al, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 48: 1034-1041 (2001)), y similares. Otros métodos o dispositivos para detectar una respuesta óptica incluyen, sin limitación, inspección visual, cámaras CCD, cámaras de video, películas fotográficas, dispositivos de escaneo láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, microscopios de epifluorescencia, microscopios de escaneo, citómetros de flujo, lectores de microplacas de fluorescencia o amplificación de señales usando tubos fotomultiplicadores.

Cualquier dispositivo o método conocido en la técnica para detectar las emisiones radiactivas de radionúclidos en un sujeto es adecuado para usar como se describe en este documento. Por ejemplo, métodos como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), que detecta la radiación de un radionúclido emisor de rayos gamma de un solo fotón utilizando una cámara gamma giratoria, y la gammagrafía de radionúclidos, que obtiene una imagen o una serie de imágenes secuenciales de la distribución de un radionúclido en tejidos, órganos o sistemas corporales utilizando una cámara gamma de centelleo, pueden utilizarse para detectar la radiación emitida por un agregado radiomarcado. La tomografía por emisión de positrones (PET) es otra técnica adecuada para detectar radiación en un sujeto.

Análisis de muestras de patología: El ARN extraído de muestras de tejido incluidas en parafina fijadas con formaldehído o paraformaldehído suele ser de mala calidad (fragmentado) y de bajo rendimiento. Esto hace que el análisis de expresión génica de genes de baja expresión en muestras histológicas o tejidos patológicos de archivo sea extremadamente difícil y, a menudo, completamente inviable. Los reactivos de detección y los métodos descritos en este documento pueden cubrir esta necesidad insatisfecha al permitir el análisis de cantidades muy pequeñas de ARN total de baja calidad.

Para usar reactivos de detección en una aplicación de este tipo, el ARN total se puede extraer de muestras de tejido incluidas en parafina fijadas con formaldehído o paraformaldehído (o similares) utilizando kits disponibles en el mercado tales como el kit de aislamiento de ácido nucleico total RecoverAll (Ambion) siguiendo los protocolos del fabricante. El ARN en tales muestras se degrada con frecuencia a fragmentos pequeños (de 200 a 500 nucleótidos de longitud), y muchas muestras histológicas incluidas en parafina solo producen decenas de nanogramos de ARN total. Pequeñas cantidades (5 a 100 ng) de este ARN total fragmentado pueden usarse directamente como analito objetivo al entrar en contacto con los reactivos de detección descritos en este documento, usando los métodos descritos en este documento.

Métodos de detección: Los métodos descritos en este documento se pueden usar, entre otras cosas, para determinar el efecto de una perturbación, incluidos compuestos químicos, mutaciones, cambios de temperatura, hormonas de crecimiento, factores de crecimiento, enfermedades o un cambio en las condiciones de cultivo, en varias moléculas objetivo, identificando así moléculas objetivo cuya presencia, ausencia o niveles son indicativos de estados biológicos particulares. En una realización, se pueden usar algunos ejemplos descritos en el presente documento para dilucidar y descubrir componentes y vías de estados patológicos. Por ejemplo, la comparación de cantidades de moléculas objetivo presentes en un tejido enfermo con tejido "normal" permite dilucidar moléculas objetivo importantes involucradas en la enfermedad, identificando así objetivos para el descubrimiento/detección de nuevos fármacos candidatos que pueden usarse para tratar la enfermedad.

Vehículos de suministro dirigidos: En algunas realizaciones, el agente terapéutico y/o de diagnóstico se puede encapsular dentro de las partículas que proporcionan sitios de conjugación para los reactivos de sonda y los marcadores de ácido nucleico. En tales realizaciones, los reactivos de detección y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para administrar un agente terapéutico y/o de diagnóstico a las células donde se unen los reactivos de sonda de los reactivos de detección. Los marcadores de ácido nucleico de los reactivos de detección se pueden detectar para controlar la ubicación de la administración del fármaco.

Seguimiento del linaje celular: En algunas realizaciones, los reactivos de detección descritos en el presente documento se pueden usar para rastrear el linaje celular, por ejemplo, en cultivo o *in vivo*. Por ejemplo, los reactivos de sonda de los reactivos de detección pueden unirse a células vivas de interés, lo que permite el marcaje y/o el seguimiento de la diferenciación celular individual. Los ejemplos de tal aplicación incluyen, pero no se limitan a, seguimiento de linaje en la diferenciación de células madre y determinación de linaje de células dendríticas y/o glóbulos blancos. En algunas realizaciones, estas células después de la determinación del linaje se pueden usar adicionalmente en consecuencia.

Kits que comprenden reactivos de detección

En el presente documento se divulgan kits para varios ensayos, pero no forman parte de la invención. En algunas realizaciones, un kit puede comprender: (a) una pluralidad de marcadores de ácido nucleico de los reactivos de detección descritos en este documento; y (b) al menos un reactivo de acoplamiento necesario para conjugar los marcadores de ácido nucleico con los reactivos de sonda de interés. En dichas realizaciones, los usuarios pueden unir los marcadores de ácido nucleico proporcionados a sus reactivos de sonda de interés para formar sus propios reactivos de detección descritos en este documento. Los ejemplos del reactivo de acoplamiento requerido para la conjugación del marcador de ácido nucleico-reactivo de sonda pueden incluir cualquier reactivo que se use generalmente para

realizar cualquiera de los métodos de conjugación descritos en este documento, por ejemplo, moléculas de biotina y de tipo avidina tales como estreptavidina o neutravidina. Sin embargo, en realizaciones alternativas, el kit puede comprender una pluralidad de los reactivos de detección descritos en el presente documento que están listos para usar y, por lo tanto, no es necesario que los usuarios realicen etapas de conjugación del marcador de ácido nucleico - reactivo de sonda antes de su uso.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además al menos un reactivo, por ejemplo, utilizado en un método de lectura descrito en el presente documento. Por ejemplo, si el método de lectura se basa en la secuenciación, el kit puede comprender además al menos un agente utilizado en la lectura basada en la secuenciación. Alternativamente, si el método de lectura se basa en la hibridación, el kit puede comprender además al menos un conjunto de sondas decodificadoras complementarias a al menos una parte de las subsecuencias de los reactivos de detección, donde cada subpoblación de las sondas decodificadoras comprende un marcador detectable diferente, produciendo cada marcador detectable diferente una firma de señal diferente.

En consecuencia, en algunas realizaciones, un kit para lectura basada en hibridación puede comprender: (a) una pluralidad de marcadores de ácido nucleico de los reactivos de detección descritos en este documento; (b) al menos un reactivo necesario para conjugar los marcadores de ácido nucleico con los reactivos de sonda de interés; y (c) al menos un conjunto de sondas decodificadoras complementarias a al menos una parte de las subsecuencias de los reactivos de detección, donde cada subpoblación de las sondas decodificadoras comprende un marcador detectable diferente, produciendo cada marcador detectable diferente una firma de señal diferente. En algunas realizaciones, el kit puede comprender además al menos un reactivo, por ejemplo, utilizado en el método de lectura.

En realizaciones alternativas, un kit para lectura basada en hibridación puede comprender: (a) una pluralidad de los reactivos de detección descritos en este documento; (b) al menos un conjunto de sondas decodificadoras complementarias a al menos una parte de las subsecuencias de los reactivos de detección, donde cada subpoblación de las sondas decodificadoras comprende un marcador detectable diferente, produciendo cada marcador detectable diferente una firma de señal diferente; y (c) al menos un reactivo.

En cualquier de las realizaciones del kit descrito en el presente documento, la pluralidad de reactivos de detección puede incluir uno o más tipos diferentes de reactivos de detección. En algunas realizaciones, es deseable proporcionar diferentes tipos de reactivos de detección (por ejemplo, diferentes tipos de reactivos de sonda, dominios de unión al objetivo y/o analitos objetivo) en contenedores separados. El número de diferentes tipos de reactivos de detección proporcionados en el kit se puede adaptar para cada aplicación descrita en este documento. En algunas realizaciones, el kit puede comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más tipos diferentes de reactivos de detección.

En cualquier realización del kit descrito en el presente documento, el kit puede comprender una pluralidad de conjuntos de sondas decodificadoras, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más conjuntos de sondas decodificadoras, donde cada conjunto de sondas decodificadoras puede dirigirse a una secuencia predeterminada diferente del marcador de ácido nucleico. En cada conjunto de sondas decodificadoras, puede haber aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más poblaciones distintas de sondas decodificadoras. Las sondas decodificadoras pueden marcarse previamente con al menos un marcador detectable o no marcarse. En algunas realizaciones en las que las sondas decodificadoras no están previamente marcadas, el kit puede comprender además una o más marcadores detectables distintos proporcionados en contenedores separados para marcar las sondas decodificadoras. En algunas realizaciones, el marcador detectable puede ser un marcador óptico descrito en este documento.

Los ejemplos de un reactivo, por ejemplo, utilizados en un método de lectura, pueden incluir, pero sin limitarse a, un reactivo de lectura, un tampón de lavado, un tampón de eliminación de señales, tampones para realizar reacciones de hibridación, endonucleasas de restricción, ligasas de ácidos nucleicos y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los reactivos de detección se pueden proporcionar en una fase de solución. En otras realizaciones, los reactivos de detección se pueden inmovilizar en un soporte o sustrato sólido.

Por "sustrato" o "soporte sólido" u otros equivalentes gramaticales en este documento se entiende cualquier material que pueda modificarse para contener sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de perlas y sea susceptible de al menos un método de detección. Como apreciarán los expertos en la técnica, el número de sustratos posibles es muy grande. Los posibles sustratos incluyen, entre otros, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, teflón, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluidos silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibra óptica y una variedad de otros polímeros. En general, los sustratos permiten la detección óptica y por sí mismos no emiten una fluorescencia apreciable.

Generalmente, el sustrato es liso (plano), aunque como apreciarán los especialistas en la técnica, también se pueden usar otras configuraciones de sustratos; por ejemplo, pueden usarse configuraciones tridimensionales, por ejemplo incorporando los reactivos de detección en un bloque poroso de plástico que permite el acceso de la muestra a los

reactivos de detección y usando un microscopio confocal para la detección. En algunas realizaciones, los reactivos de detección se pueden colocar en la superficie interior de un tubo, para el análisis de muestra de flujo continuo para minimizar el volumen de muestra. Los sustratos preferidos incluyen haces de fibras ópticas y sustratos lisos planos tales como vidrio, poliestireno y otros plásticos y acrílicos. En alguna realización, el soporte o sustrato sólido puede ser una placa de múltiples pocillos.

Además de los componentes mencionados anteriormente, el kit puede incluir material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de mercadeo u otro material relacionado con los métodos descritos en este documento y/o el uso de los agregados para los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, el material informativo describe métodos para administrar los reactivos de detección a un sujeto y/o incluye instrucciones para marcar sondas decodificadoras con marcadores detectables proporcionadas allí y/o instrucciones para conjugar al menos un marcador de ácido nucleico con un reactivo de sonda. El kit también puede incluir un dispositivo de suministro.

En algunas realizaciones, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar la formulación de una manera adecuada, por ejemplo, en una dosis, forma de dosificación o modo de administración adecuados (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación o modo de administración descritos en este documento). En otra realización, el material informativo puede incluir instrucciones para identificar un sujeto adecuado, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, un ser humano adulto. El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, las instrucciones, se proporciona en material impreso, por ejemplo, un texto impreso, un dibujo y/o una fotografía, por ejemplo, un marcador o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, tal como Braille, material legible por ordenador, grabación de video o grabación de audio. En otra realización, el material informativo del kit es un enlace o información de contacto, por ejemplo, una dirección física, una dirección de correo electrónico, un hipervínculo, un sitio web o un número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustancial sobre la formulación y/o su uso en los métodos descritos en este documento. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes, divisores o compartimentos separados para cada componente y material informativo. Por ejemplo, cada componente diferente puede estar contenido en una botella, vial o jeringa, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un único contenedor no dividido. Por ejemplo, la formulación está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene adjunto el material informativo en forma de una etiqueta.

En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad, por ejemplo, un paquete, de recipientes individuales, cada uno de los cuales contiene una o más formas de dosificación unitaria de la composición que comprende los reactivos de detección. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de aluminio o paquetes de ampollas, cada uno de los cuales contiene una única dosis unitaria de la formulación. Los contenedores de los kits pueden ser herméticos y/o impermeables.

Algunas definiciones seleccionadas

A menos que se indique lo contrario, o esté implícito en el contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados proporcionados a continuación. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o que resulte evidente por el contexto, los términos y frases a continuación no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en el arte al que pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar a describir realizaciones particulares de los aspectos descritos en este documento, y no pretenden limitar la invención reivindicada, porque el alcance de la invención está limitado únicamente por las reivindicaciones. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluyen los plurales y los términos plurales incluyen el singular.

Como se usa en este documento, el término "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a composiciones, métodos y componente o componentes respectivos de los mismos, que son esenciales para la invención, pero abiertos a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esenciales o no. Además, el término "que comprende" o "comprende" incluye "que consiste esencialmente en" y "que consiste en".

Como se usa en este documento, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a los elementos requeridos para una realización dada. El término permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente la característica o características básicas y novedosas o funcionales de esa realización de la invención.

El término "que consta de" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como se describe en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la realización.

Aparte de los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizados en este documento deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con porcentajes puede significar $\pm 1\%$.

Los términos singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 5 Los métodos y materiales descritos en este documento se pueden usar en la práctica o prueba de esta divulgación. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura, "e.g." se deriva del latín *exempli gratia*, y se usa en este documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por lo tanto, la abreviatura "e.g." es sinónimo del término "por ejemplo".

- 10 Como se usa en este documento, el término "identificador" generalmente se refiere a una expresión única para distinguir variaciones de una a otra entre una clase de sustancias, elementos u objetos. En realizaciones particulares, el término "identificador" como se usa en este documento se refiere a la asociación de una subsecuencia predeterminada única a un reactivo de sonda específico, confirmando así la presencia e identidad del reactivo de sonda cuando se detecta la subsecuencia predeterminada.

- 15 El término "estadísticamente significativo" o "significativamente" se refiere a la significancia estadística y generalmente significa una desviación estándar de dos (2SD) por encima o por debajo de un nivel de referencia. El término se refiere a la evidencia estadística de que existe una diferencia. Se define como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es realmente verdadera. La decisión a menudo se toma utilizando el valor p.

- 20 Como se usa en este documento, el término "sustancialmente" significa una proporción de al menos aproximadamente 60 %, o preferiblemente al menos aproximadamente 70 % o al menos aproximadamente 80 %, o al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente 99 % o más, o cualquier número entero entre el 70 % y el 100 %. En algunas realizaciones, el término "sustancialmente" significa una proporción de al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o más, o cualquier número entero entre el 90 % y el 100 %. En algunas realizaciones, el término "sustancialmente" puede incluir el 100%.

- 25 El término "esfera" significa una partícula que tiene una relación de aspecto de 3:1 como máximo. El término "relación de aspecto" significa la relación entre el eje más largo de un objeto y el eje más corto del objeto, donde los ejes no son necesariamente perpendiculares.

El término "varilla" significa una partícula que tiene una dimensión más larga de como máximo 5,000 nm, y que tiene una relación de aspecto de 3:1 a 20:1.

El término "prisma" significa una partícula que tiene al menos dos caras no paralelas conectadas por un borde común.

- 30 Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración de los reactivos de detección. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de absorción e isotónicos y similares que sean compatibles con la actividad de los reactivos de detección y que sean fisiológicamente aceptables para el sujeto. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1)
- 35 azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) polvo de tragacanto; (5) malta; (6) gelatina; (7) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9)
- 40 aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones
- 45 tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (22) agentes de carga, tales como polipéptidos y aminoácidos; (23) componentes del suero, tales como albúmina sérica, HDL y LDL; (22) alcoholes C2-C12, tales como etanol; y (23) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes en la formulación agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.
- 50 Los términos tales como "excipiente", "vehículo", "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usan indistintamente en este documento.

- 55 Como se usa en este documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción razonable de beneficio/riesgo.

Como se usa en este documento, el término "agente terapéutico" se refiere a un agente biológico o químico usado para tratar, curar, mitigar o prevenir condiciones nocivas en un sujeto. El término "agente terapéutico" también incluye sustancias y agentes para combatir una enfermedad, afección o trastorno de un sujeto, e incluye fármacos,

compuestos de diagnóstico e instrumentación. "Agente terapéutico" también incluye cualquier cosa utilizada en el diagnóstico médico, o en la restauración, corrección o modificación de funciones fisiológicas. Los términos "agente terapéutico" y "agente farmacéuticamente activo" se usan indistintamente en este documento.

- 5 Un agente terapéutico puede seleccionarse de acuerdo con el objetivo del tratamiento y la acción biológica deseada. Por lo tanto, un agente terapéutico puede seleccionarse de cualquier clase adecuada para el objetivo terapéutico. Además, el agente terapéutico puede seleccionarse o disponerse para proporcionar actividad terapéutica durante un período de tiempo.

- 10 Los ejemplos de compuestos farmacéuticamente activos incluyen, pero no se limitan a, los que se encuentran en Harrison's Principles of Internal Medicine, decimotercera edición, Eds. T.R. Harrison McGraw-Hill N.Y., NY; Physicians Desk Reference, quincuagésima edición, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.; Pharmacological Basis of Therapeutics, octava edición, Goodman and Gilman, 1990; United States Pharmacopoeia, The National Formulary, USP XII NF XVII, 1990; edición actual de Goodman and Oilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics; y la edición actual de The Merck Index.

- 15 Ejemplos de agentes farmacéuticamente activos incluyen, pero no se limitan a, agentes antiinflamatorios esteroides y no esteroides, fármacos antirestenóticos, agentes antimicrobianos, factores angiogénicos, bloqueadores de los canales de calcio, agentes trombolíticos, agentes antihipertensivos, anticoagulantes, agentes antiarrítmicos, glucósidos cardíacos y similares.

- 20 En algunas realizaciones, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ácido salicílico y derivados (aspirina), para-aminofenol y derivados (acetaminofén), ácidos arilpropiónicos (ibuprofeno), corticosteroides, antagonistas de los receptores de histamina y antagonistas de los receptores de bradiquinina, antagonistas de los receptores de leucotrienos, antagonistas de los receptores de prostaglandinas, antagonistas de los receptores del factor activador de plaquetas, sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas, penicilinas, cefalosporina, factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento transformante angiogénico alfa y beta, factor de necrosis tumoral, angiopoyetina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, dihidropiridinas (p. ej., nifedipina, benzotiazepinas tales como diltazem y fenilalquilaminas tales como verapamilo), activador del plasminógeno uroquinasa, uroquinasa, estreptoquinasa, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), espironolactona, activador tisular del plasminógeno (tPA), diuréticos, tiazidas, agentes antiadrenérgicos, clonidina, propranolol, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, captopril, antagonistas de los receptores de angiotensina, losartán, antagonistas de los canales de calcio, nifedina, heparina, warfarina, hirudina, péptido anticoagulante de garrapatas y heparinas de bajo peso molecular tales como enoxaparina, lidocaína, procainamida, encainida, flecanida, bloqueadores beta adrenérgicos, propranolol, amiodarona, verapamilo, diltiazem, cloruro de níquel, glucósidos cardíacos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de los receptores de angiotensina, nitrovasodilatadores, agentes hipolipidémicos (p. ej., ácido nicotínico, probucol, etc.), resinas que se unen a ácidos biliares (p. ej., colestiramina, y derivados del ácido fibrótico, por ejemplo, clofibrato), inhibidores de la HMG CoA reductasa, inhibidores de la HMG CoA sintasa, inhibidores de la escualeno sintasa, inhibidores de la escualeno epoxidasa, estatinas (por ejemplo, lovastatina, cerivastatina, fluvastatina, pravastatina, simvastatina, etc.), antipsicóticos, SSRI, medicamentos anticonvulsivos, anticonceptivos, analgésicos sistémicos y locales (dolor crónico, factores de crecimiento/remodelación ósea (factores estimulantes y reclutadores de osteoblastos/osteoclastos), neurotransmisores (L-DOPA, dopamina, neuropéptidos), fármacos para el enfisema, TGF-beta), rapamicina, naloxona, paclitaxel, anfotericina, dexametasona, flutamida, vancomicina, fenobarbital, cimetidina, atenolol, aminoglucósidos, hormonas (p. ej., hormona liberadora de tirotropina, p-nitrofenil beta-celopenaóido y hormona liberadora de la hormona luteinizante), vincristina, amilorida, digoxina, morfina, procainamida, quinidina, quinina, ranitidina, triamtereno, trimetoprim, vancomicina, aminoglucósidos y penicilina, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 45 Como se usa en este documento, el término "color fluorescente" se refiere a un color emitido por cualquier fluoróforo (p. ej., tinte fluorescente, partículas fluorescentes tales como puntos cuánticos y/o proteínas fluorescentes) tras la excitación con luz y/o radiación electromagnética. El tinte fluorescente, como se divulga en el presente documento, se refiere a un tinte que exhibe energía y es visible bajo iluminación a una longitud de onda predefinida. Numerosas moléculas fluorescentes están disponibles comercialmente y pueden adaptarse para su uso en los métodos, reactivos de detección y kits como se divulga en el presente documento, e incluyen las de Molecular Probes, Sigma y otras fuentes comerciales similares. En algunas realizaciones, se puede producir un "color fluorescente" mediante fosforescencia. En algunas realizaciones, se puede producir un "color fluorescente" mediante luminiscencia (incluida la bioluminiscencia).

- 55 En la medida en que no se haya indicado ya, los expertos en la materia entenderán que cualquiera de las diversas realizaciones en este documento descritas e ilustradas puede modificarse adicionalmente para incorporar características mostradas en cualquiera de las otras realizaciones divulgadas en este documento.

Los siguientes ejemplos ilustran algunas realizaciones de la divulgación. Los siguientes ejemplos no limitan en modo alguno la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ejemplos de métodos de detección basados en hibridación de reactivos de detección

Se preparó una suspensión en solución de Dynabeads recubiertas con estreptavidina (de aproximadamente 1 µm), cada una conjugada con una de los seis marcadores de ácido nucleico y un reactivo de sonda correspondiente específico para un analito objetivo, en la que cada uno de los marcadores de ácido nucleico comprendía al menos una subsecuencia predeterminada, por ejemplo, una primera (por ejemplo, A1, A2 y A3) y una segunda (B1, B2 y B3) subsecuencia predeterminada. Los marcadores de ácido nucleico pueden comprender una secuencia de ácido nucleico de cualquier longitud. En algunas realizaciones, los marcadores de ácido nucleico pueden comprender al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos o al menos 24 nucleótidos. Una muestra que contenía múltiples analitos objetivo se puso en contacto con las Dynabeads específicas del analito objetivo, de modo que las Dynabeads se unirían al analito objetivo respectivo en la muestra. A continuación, se eliminó cualquier Dynabeads no unidas, por ejemplo, mediante lavado. En la primera lectura, un conjunto de tres sondas decodificadoras, cada una con una secuencia distinta complementaria a las primeras subsecuencias predeterminadas (p. ej., A1*, A2*, y A3*) y un marcador óptico correspondiente (por ejemplo, seleccionado de rojo, verde o en blanco), se agregó a la muestra con Dynabeads unidas y luego se tomaron imágenes con microscopía fluorescente (Figura 6A). A continuación, se eliminó la señal fluorescente, por ejemplo, mediante fotoblanqueo, de la etapa anterior antes de la siguiente lectura. En la segunda lectura, un conjunto diferente de tres sondas decodificadoras, cada una con una secuencia complementaria distinta a las segundas subsecuencias predeterminadas (p. ej., B1*, B2*, B3*) y un marcador óptico correspondiente (p. ej., seleccionada de rojo, verde, en blanco), se añadió a la muestra fotoblanqueada y luego se tomaron imágenes con microscopía fluorescente (Figura 6B). A continuación, se puede analizar la secuencia temporal de las firmas ópticas obtenidas de cada perla para determinar la identidad de la sonda y, por lo tanto, la presencia del analito objetivo correspondiente en la muestra. En función de la intensidad y/o la cobertura de las señales ópticas, también se puede determinar la cantidad del analito objetivo.

Solo a modo de ejemplo, un anticuerpo biotinilado anti-*C. albicans* (p. ej., un anticuerpo comercialmente disponible a través de Pierce Antibodies PA1-27145) se conjugó con una pluralidad de marcadores de ácido nucleico biotinilados diferentes (p. ej., 8 secuencias de marcadores SeqTag biotinilados diferentes) usando cualquier método de conjugación conocido en la técnica. En una realización, el anticuerpo biotinilado anti-*C. albicans* se conjugó con una pluralidad de marcadores de ácido nucleico biotinilados diferentes (p. ej., secuencias de marcadores SeqTag biotinilados) utilizando una proteína similar a la estreptavidina (p. ej., neutravidina) como puente. Las secuencias de marcadores SeqTag se muestran en la Tabla 5. Las secuencias de marcadores SeqTag pueden comprender al menos aproximadamente 24 nucleótidos. En algunas realizaciones, las secuencias de marcadores SeqTag pueden comprender ADN, ARN o una combinación de los mismos. Cada conjugado se incubó con una muestra que comprendía *C. albicans*, lavado, y leído utilizando cualquier método de lectura como se describe en este documento, por ejemplo, el método de hibridación por desplazamiento.

Tabla 5. Secuencias de ADN de ejemplos de marcadores SeqTag

SEQ ID NO:	Marcador de SeqTag	Secuencia de ADN
59	SeqTag 1	5'-biotina - TTTCGCTTTCTGTAATGGAGTGGGA - 3'
60	SeqTag 2	5'-biotina - TTTCGCTTTAGCCTAAGTGAAATC - 3'
61	SeqTag 3	5'-biotina - TTTCGCTTTTTTGGGGAAAAGACA - 3'
62	SeqTag 4	5'-biotina - TTTCGCTTTTAGGCATTAGCATTG - 3'
63	SeqTag 5	5'-biotina - TTTCGCTTTGGAAGCACCTATTCC - 3'
64	SeqTag 6	5'-biotina - TTTCGCTTTCTGGAGAAAGGGCCA - 3'
65	SeqTag 7	5'-biotina - TTTCGCTTTTCGGTTCCAAAGACAC - 3'
66	SeqTag 8	5'-biotina - TTTCGCTTTGAAGCCGGTTATAGC - 3'

Durante el método de hibridación por desplazamiento, solo a modo de ejemplo, como se muestra en Figura 7, la levadura se incubó en la etapa de lectura 1 con una mezcla de las tres sondas decodificadoras del "conjunto 1", seguido de una incubación con una mezcla de las sondas decodificadoras del "conjunto 2" y los desplazadores del "conjunto 1" (que son secuencias de ácido nucleico para eliminar la fluorescencia del "conjunto 1"), y de manera similar con los conjuntos apropiados de sondas decodificadoras y desplazadores para las etapas 3 y 4. Las sondas decodificadoras pueden comprender una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN o una combinación de los mismos) y un marcador de detección, por ejemplo, en su extremo 5'. La secuencia de ácido nucleico de las sondas decodificadoras puede tener cualquier longitud. En algunas realizaciones, las sondas decodificadoras pueden comprender al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos aproximadamente 12 nucleótidos, al menos aproximadamente 14 nucleótidos, al menos aproximadamente 16 nucleótidos, al menos aproximadamente 18 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos o más. Los marcadores de detección pueden ser cualquier marcador reconocido en la técnica descrito en este documento, por ejemplo, marcadores de detección fluorescentes tales como FAM, Cy3 y C5, o cualquier marcador descrito en este documento. Los desplazadores de sonda, como se describió anteriormente, son secuencias de ácido nucleico que se utilizan para eliminar o desplazar las sondas

5 decodificadoras anteriores hibridadas con los marcadores de ácido nucleico (p. ej., marcadores SeqTag) de modo que se pueda agregar e hibridar un conjunto diferente de sondas decodificadoras con los marcadores de ácido nucleico. Los desplazadores de sonda pueden tener una secuencia de ácido nucleico de cualquier longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de los desplazadores de sonda puede ser más larga que la de las sondas decodificadoras. En algunas realizaciones, los desplazadores de sonda pueden comprender al menos aproximadamente 12 nucleótidos, al menos aproximadamente 14 nucleótidos, al menos aproximadamente 16 nucleótidos, al menos aproximadamente 18 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 21 nucleótidos o más. Las Tablas 2 y 3 muestran secuencias de ADN de ejemplos de sondas decodificadoras (o sondas de lectura) y desplazadores de sonda, respectivamente. Como se observa en la Figura 7, cada anticuerpo biotinilado anti-*C. albicans* conjugado con una secuencia marcadora SeqTag diferente tiñó adecuadamente la levadura y emitió fluorescencia solo de acuerdo con lo designado por su marcador SeqTag con conjuntos apropiados de sondas decodificadoras y desplazador de sonda en cada etapa de lectura.

Tabla 6. Secuencias de ADN de ejemplos de sondas decodificadoras

SEQ ID NO:	Sonda de lectura	Secuencia de ADN
67	Conjunto 1 FAM	5'-FAM - TTTTCCAATCCATTACAG - 3'
68	Conjunto 1 Cy3	5'-Cy3 - TTTGATTTCACTTAGGCT - 3'
69	Conjunto 1 Cy5	5'-Cy5 - TTTTGTCTTTTCCCCAAA - 3'
70	Conjunto 2 FAM	5'-FAM - TTTCAATGCTAATGCCTA - 3'
71	Conjunto 2 Cy3	5'-Cy3 - TTTGGAATAGGTGCTTTCC - 3'
72	Conjunto 2 Cy5	5'-Cy5 - TTTTGGCCCTTTCTCCAG - 3'
73	Conjunto 3 FAM	5'-FAM - TTTGTGTCTTTGGAACCG - 3'
74	Conjunto 3 Cy3	5'-Cy3 - TTTGCTATAACCGGCTTC - 3'

Tabla 7. Secuencias de ADN de ejemplos de desplazadores de sonda

SEQ ID NO:	Desplazador de sonda	Secuencia de ADN
75	Conjunto 1 FAM-Desplazador	5' - TCCAATCCATTACAGAAAGCG - 3'
76	Conjunto 1 Cy3-Desplazador	5' - GATTTCACTTAGGCTAAAGCG - 3'
77	Conjunto 1 Cy5-Desplazador	5' - TGTCTTTTCCCCAAAAAGCG - 3'
78	Conjunto 2 FAM-Desplazador	5' - CAATGCTAATGCCTAAAAGCG - 3'
79	Conjunto 2 Cy3-Desplazador	5' - GGAATAGGTGCTTCCCAAAGCG - 3'
80	Conjunto 2 Cy5-Desplazador	5' - TGGCCCTTTCTCCAGAAAGCG - 3'
81	Conjunto 3 FAM-Desplazador	5' - TGTGTCTTTGGAACCGAAAGCG - 3'
82	Conjunto 3 Cy3-Desplazador	5' - GCTATAACCGGCTTCAAAGCG - 3'

El contenido de todas las patentes y otras publicaciones identificadas en este documento se proporciona únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención anterior o por cualquier otro motivo. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituye ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una pluralidad de analitos de una célula o tejido *in situ*, que comprende:
 - (a) poner en contacto dicha célula o tejido con una composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección, donde dicha célula o tejido está montado sobre un soporte sólido, donde un reactivo de detección de dicha pluralidad de reactivos de detección comprende (i) al menos una sonda dirigida a un analito de dicha pluralidad de analitos y (ii) al menos un marcador de ácido nucleico que comprende una pluralidad de subsecuencias predeterminadas, donde dicha al menos una sonda y dicho al menos un marcador de ácido nucleico están conjugados entre sí;
 - (b) eliminar cualquier reactivo de detección no unido de dicha célula o tejido;
 - (c) mientras dicho reactivo de detección se une a dicho analito en dicha célula o tejido, secuenciar de manera secuencial en el tiempo dicha pluralidad de subsecuencias predeterminadas *in situ*; y
 - (d) usar dicha pluralidad de subsecuencias predeterminadas identificadas en (c) para identificar dicho analito.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha célula o tejido es una célula o tejido fijado.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho reactivo de detección es de una pluralidad de reactivos de detección que tienen sondas que se dirigen a diferentes analitos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además procesar dicha célula o tejido antes de poner en contacto dicha célula o tejido con dicha composición que comprende una pluralidad de reactivos de detección.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho procesamiento comprende el procesamiento mecánico de dicha célula o tejido, la adición de al menos un reactivo a dicha célula o tejido, la separación de dicha célula o tejido, la fijación de dicha célula o tejido, o cualquier combinación de los mismos.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha al menos una sonda y dicho al menos un marcador de ácido nucleico se conjugan entre sí mediante al menos un enlazador.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho al menos un enlazador es un enlace, una molécula enlazadora, un enlazador multivalente o una partícula.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha al menos una sonda se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico, un anticuerpo o una porción del mismo, una molécula similar a un anticuerpo, una enzima, un antígeno, una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un peptidomimético, un azúcar, un carbohidrato, un lípido, un glicano, una glicoproteína, un aptámero y cualquier combinación de los mismos.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho al menos un marcador de ácido nucleico es de cadena sencilla, de cadena doble, parcialmente de cadena doble, una horquilla, lineal, circular, ramificado, concatémico o cualquier combinación de los mismos.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las subsecuencias predeterminadas de dicha pluralidad de subsecuencias predeterminadas se conjugan entre sí mediante al menos un enlazador de secuencia.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho enlazador de secuencia es un enlace o un enlazador nucleotídico.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho enlazador nucleotídico es de cadena sencilla, de cadena doble, parcialmente de cadena doble, una horquilla o cualquier combinación de los mismos; opcionalmente en el que dicho enlazador nucleotídico comprende una pluralidad de nucleótidos.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - (i) dicho reactivo de detección comprende una sonda y una pluralidad de marcadores de ácido nucleico;
 - (ii) dicho reactivo de detección comprende una pluralidad de sondas y un marcador de ácido nucleico; o
 - (iii) dicho reactivo de detección comprende una pluralidad de sondas y una pluralidad de marcadores de ácido nucleico.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho analito se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, en el que dichos ácidos nucleicos se seleccionan del grupo que consiste en ADN o ARN celular, ARN mensajero, microARN, ARN ribosómico y cualquier combinación de los mismos.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho soporte sólido es un portaobjetos de microscopía.

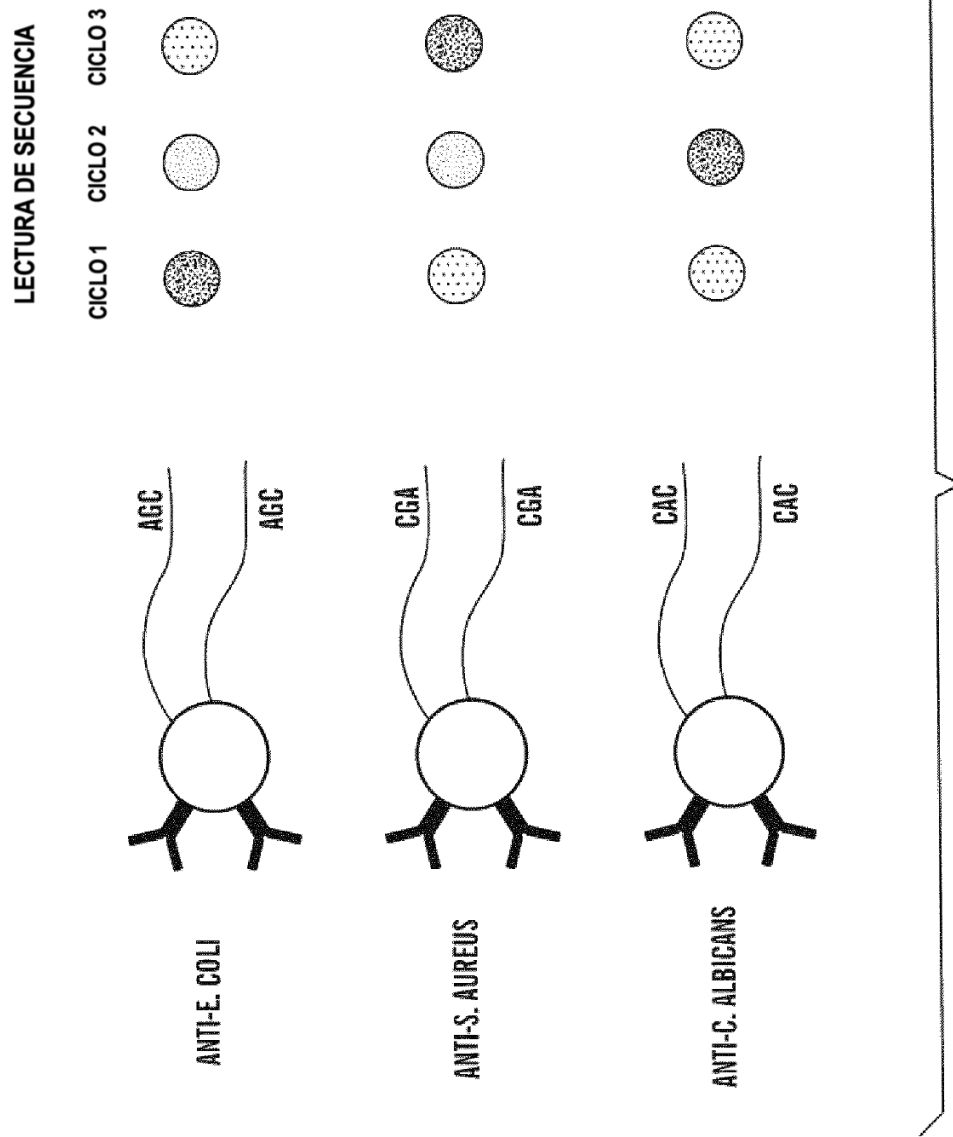


FIG. 1

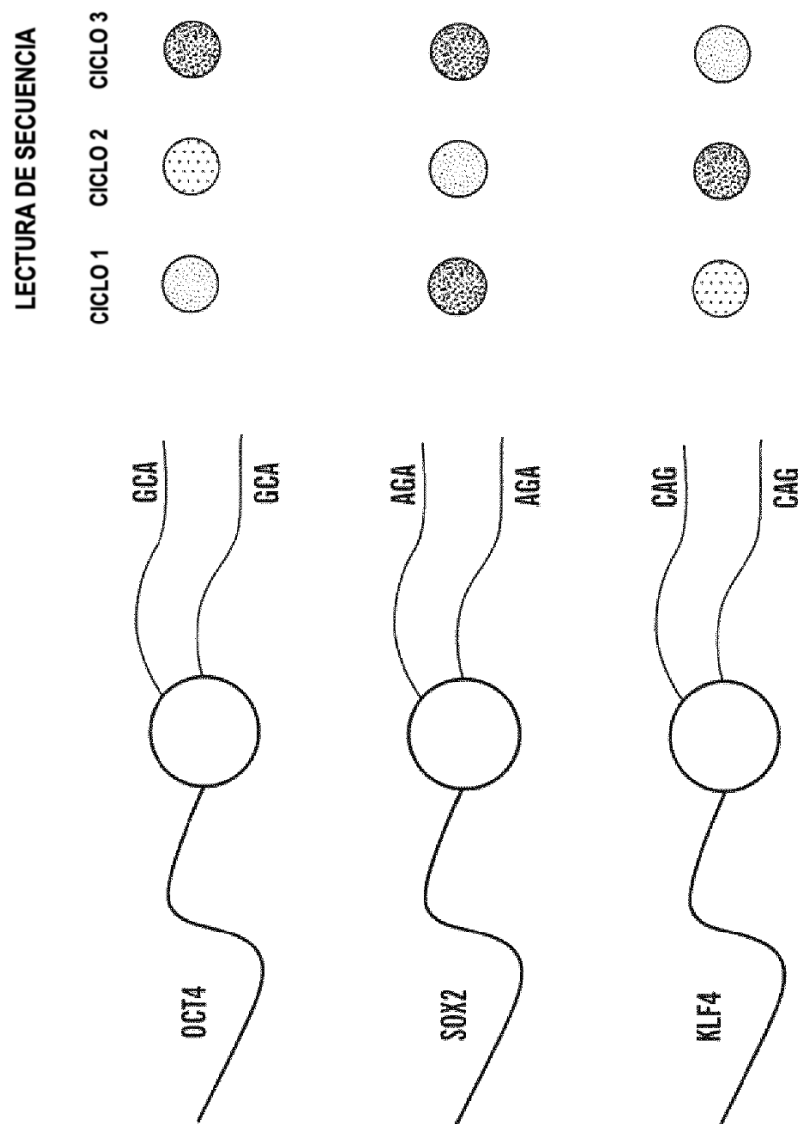
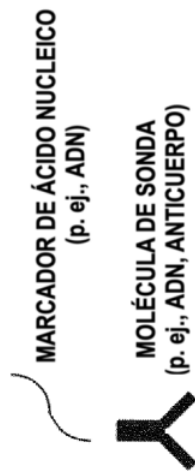
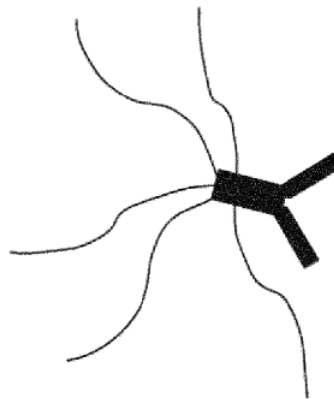


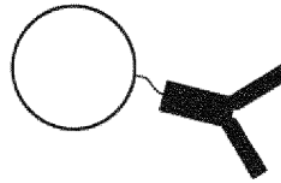
FIG. 2



A) MARCACIÓN DIRECTA CON
ADN LINEAL



B) MARCACIÓN DIRECTA CON
ADN CIRCULAR



C) MARCACIÓN CON CONCATÉMERO
DE ADN

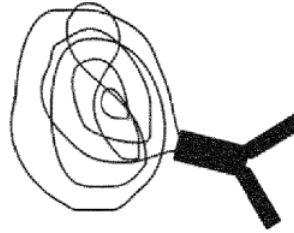


FIG. 3

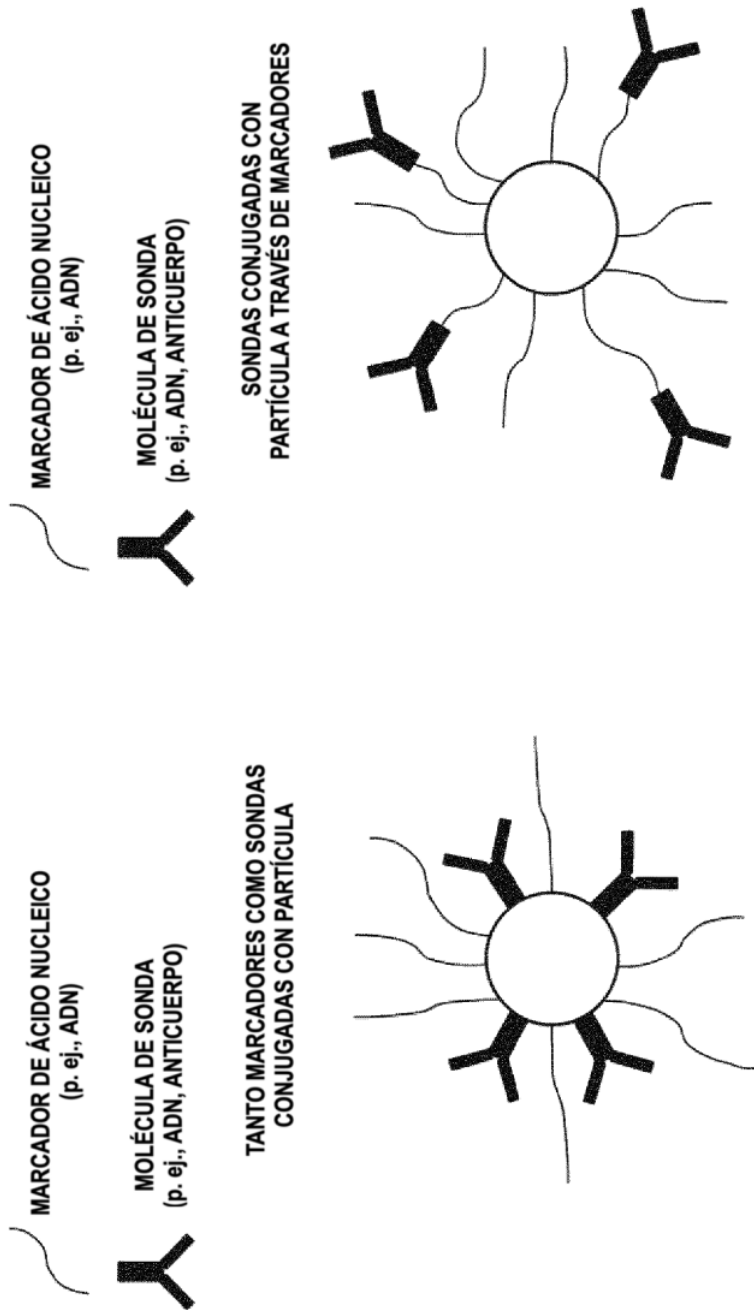


FIG. 4B

FIG. 4A

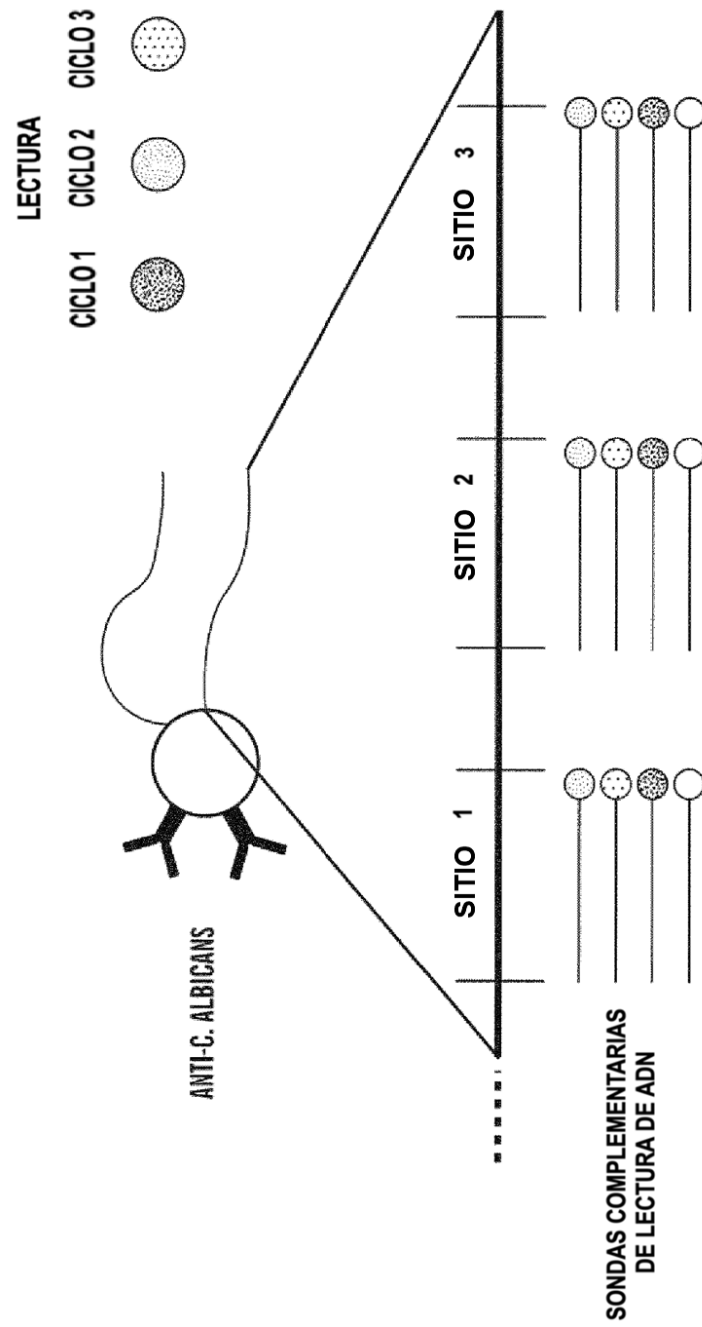
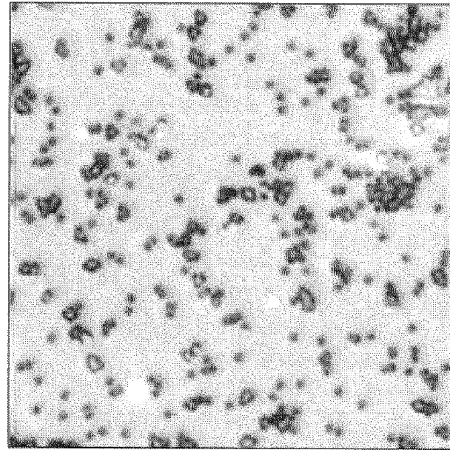
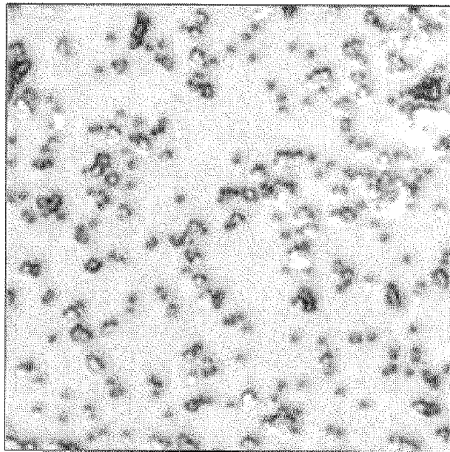


FIG. 5



ETAPA DE LECTURA 2

FIG. 6B



ETAPA DE LECTURA 1

FIG. 6A

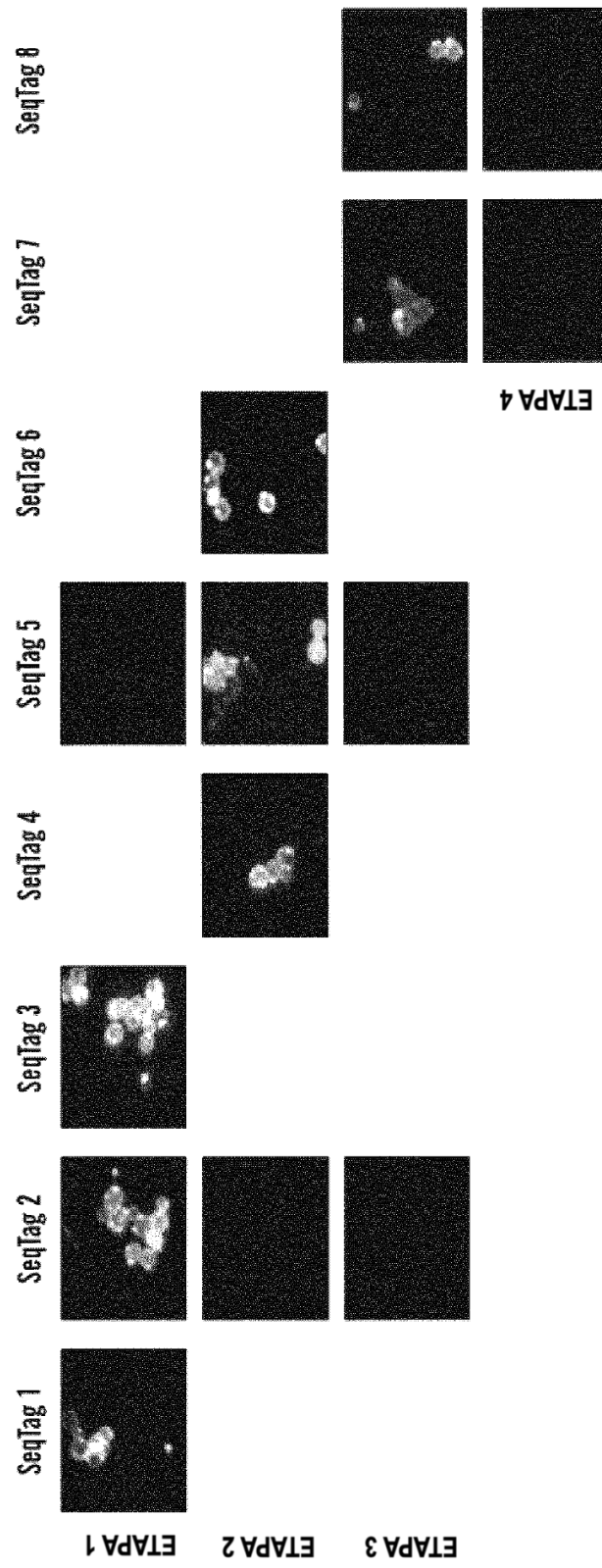
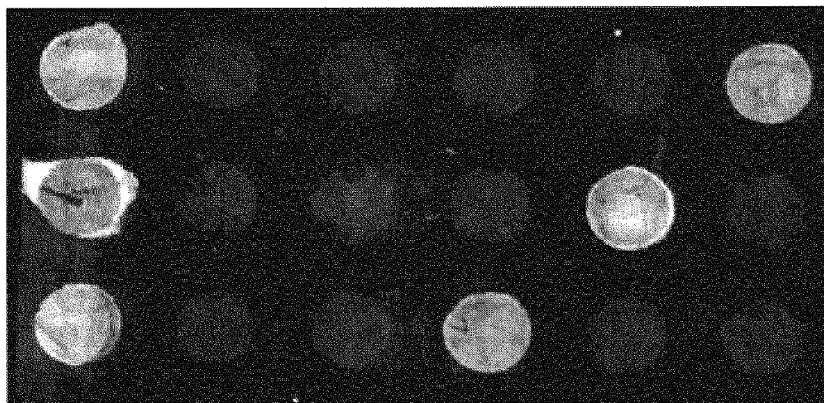


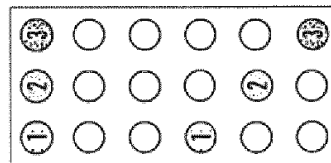
FIG. 7

ETAPA 2

ETAPA 1 COMO SE OBSERVA



ETAPA 1
OBJETIVO



ETAPA 2
OBJETIVO

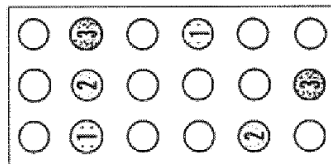


FIG. 8

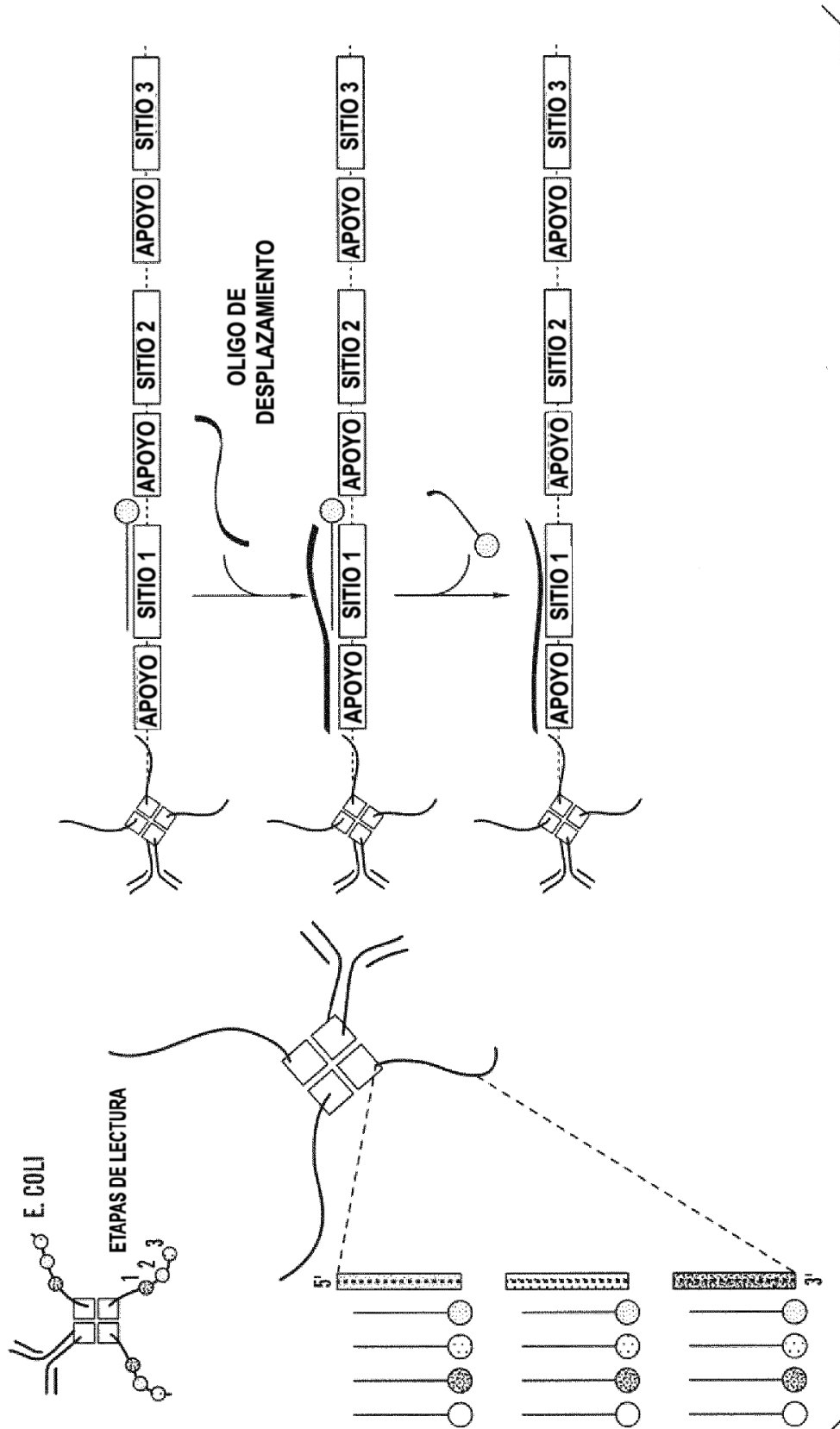


FIG. 9

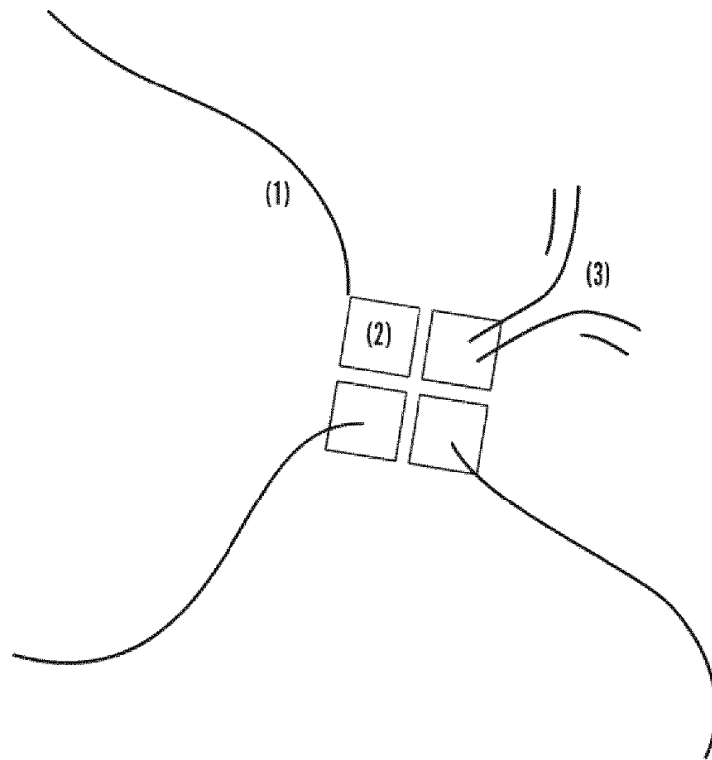


FIG. 10

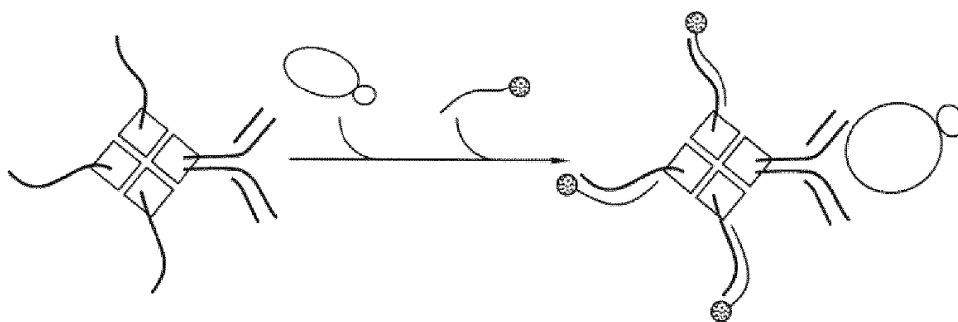


FIG. 11

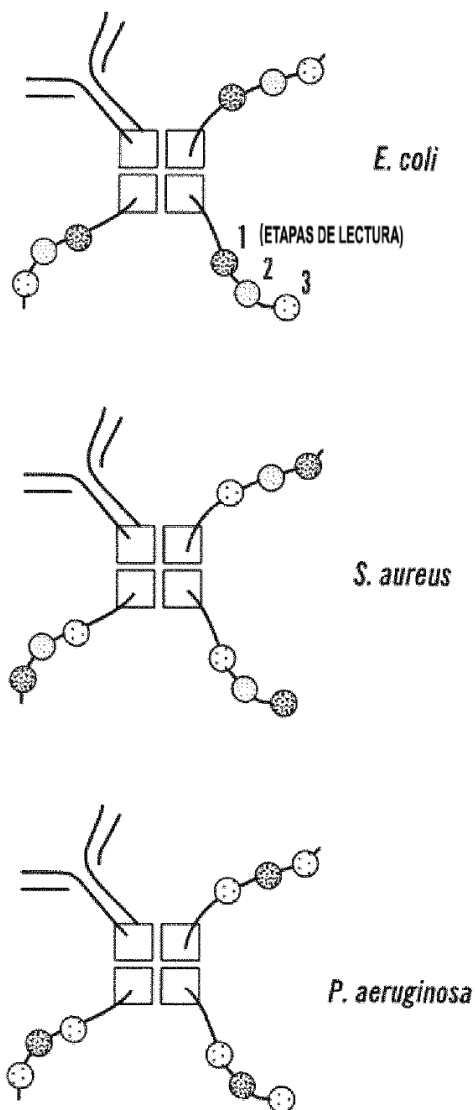


FIG. 12

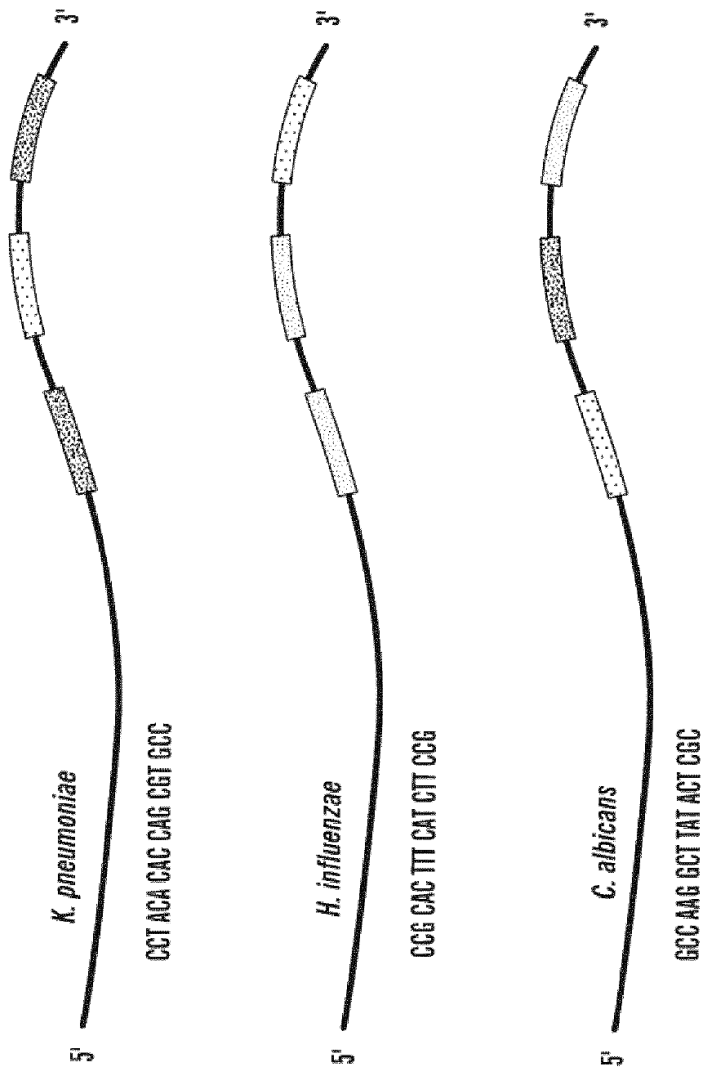


FIG. 13