

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 726**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6804 (2008.01)

C12Q 1/6823 (2008.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2014 E 19183482 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 3587585**

54 Título: **Métodos, kits, y sistemas para la detección multiplexada de moléculas diana y sus usos**

30 Prioridad:

12.06.2013 US 201361834111 P

05.12.2013 US 201361912054 P

31.03.2014 US 201461972940 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2021

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)**

**55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**WEISSLEDER, RALPH;
AGASTI, SARIT S.;
PETERSON, VANESSA M. y
ULLAL, ADEETI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 887 726 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, kits, y sistemas para la detección multiplexada de moléculas diana y sus usos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a métodos para la detección de una pluralidad de moléculas diana en una muestra. Los métodos, kits y sistemas descritos en este documento pueden usarse en aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, control de calidad y detección.

Antecedentes

10 Un número creciente de ensayos clínicos, por ejemplo, ensayos para cáncer, requieren muestras de pacientes, por ejemplo, biopsias de tejido, para medir marcadores de respuesta a fármacos individuales [1]. Por ejemplo, los tejidos recolectados quirúrgicamente a menudo se usan para recolectar datos en dos extremos del espectro celular: (i) análisis genómicos que revelan oncogenes conductores y mutaciones específicas [2] y (ii) análisis de proteínas de biomarcadores seleccionados destinados a monitorizar las respuestas celulares [3, 4]. Idealmente, las muestras clínicas se recolectan en serie para controlar el cambio en los niveles de expresión de proteínas clave. Esto plantea muchos desafíos, en particular el riesgo de morbilidad con la repetición de biopsias centrales, el aumento de los costes y las limitaciones logísticas. Los métodos alternativos de recolección de muestras incluyen aspirados de aguja fina (FNA), "biopsias líquidas" de células tumorales circulantes o análisis de células escasas presentes en otros fluidos fáciles de recolectar. Sin embargo, estas muestras tienen un número de células mucho menor que las biopsias, lo que limita el número de proteínas que se pueden analizar.

20 Después de tomar muestras de tejidos, puede ser difícil seleccionar biomarcadores ubicuos debido a la heterogeneidad y los cambios dinámicos de la red. Por lo general, los fármacos de molécula pequeña influyen en más de una proteína diana, mientras que numerosas proteínas modulan las acciones específicas de los fármacos, desencadenan vías moleculares alternativas e inducen la muerte o resistencia de las células tumorales [5]. Las herramientas actuales para perfilar estas proteínas clave en muestras clínicas escasas son limitadas; la práctica estándar abarca la inmunocitología, que a menudo impide el análisis amplio de proteínas debido a la muestra insuficiente dentro de FNA o biopsias líquidas [6]. Por lo tanto, el número de marcadores a menudo es limitado (<10) y requiere análisis de secciones de tejido que requieren mucho tiempo. Los análisis proteómicos por espectrometría de masas siguen siendo un desafío técnico para las células individuales y la detección fosfoproteómica y son costosos para fines clínicos de rutina [7]. En entornos de investigación, la citometría de flujo multiplexado y la citometría de masas se han utilizado para examinar un conjunto ampliado de marcadores (10 a 45) utilizando poblaciones de células individuales. Sin embargo, la citometría de flujo multiplexada a menudo encuentra límites en la cantidad de marcadores que puede medir debido a la superposición espectral. La citometría de masas vaporiza las células durante la preparación de la muestra, lo que resulta en pérdida de muestra [8]. Por consiguiente, ambos métodos existentes no permiten aislar una célula rara de interés o realizar análisis genéticos concurrentes una vez que se usan muestras para análisis proteómicos.

35 El documento WO 2011/143583 A1 se refiere a composiciones y métodos para analizar la presencia de un analito diana en una muestra utilizando un soporte sólido. Agasti, S.S et al., Journal of the American Chemical Society, vol. 134, no. 45, páginas 18499-18502, se refiere a un método de conjugado de anticuerpo-código de barras de ADN fotoescindible para la detección rápida, cuantitativa y multiplexada de proteínas en células vivas individuales. Nam, J-M et al., Science, vol. 301, número 5641, páginas 1884-1886 se refiere a un método para detectar analitos de proteínas utilizando sondas de micropartículas magnéticas con anticuerpos que se unen específicamente a una diana de interés, y sondas de nanopartículas que están codificadas con ADN que es exclusivo de la diana de proteína y anticuerpos que pueden emparejar la diana capturada por las sondas de micropartículas.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones y métodos para la detección simultánea de una gran cantidad de moléculas diana de una muestra.

45 Resumen

Las realizaciones de diversos aspectos descritos en el presente documento se basan, en parte, en el desarrollo de un método que no solo permite el análisis de cientos de proteínas de una cantidad limitada de muestra, por ejemplo, aspirados de aguja fina (FNA) mínimamente invasivos, que contienen cantidades mucho más pequeñas de células que las biopsias centrales, pero también preserva el material genético de la misma muestra para permitir mediciones simultáneas de proteínas y materiales genéticos (por ejemplo, ADN, ARN y microARN). En particular, el método se basa en la detección de anticuerpos con código de barras de ADN, donde los códigos de barras, cadenas simples de ADN, pueden ser fotoescindidas y detectadas utilizando sondas fluorescentes complementarias sin ningún paso de amplificación, y se conoce como un código de barras de anticuerpos con plataforma de ADN fotoescindible (ABCD) en el presente. Para demostrar la capacidad de la plataforma ABCD, los inventores aislaron células cancerosas dentro de los FNA de los pacientes y expusieron estas células a una mezcla de aproximadamente 90 anticuerpos con código de barras de ADN, que cubren los procesos distintivos en el cáncer (por ejemplo, apoptosis y daño en el ADN). Los inventores descubrieron que el análisis de proteínas unicelulares de los FNA de los pacientes mostró una alta heterogeneidad intratumoral, lo que indica la capacidad de la plataforma ABCD para realizar perfiles de proteínas en

células individuales raras, incluidas, entre otras, células tumorales circulantes. Además, los inventores descubrieron que los pacientes que mostraban una histopatología idéntica mostraban heterogeneidad del paciente en el perfil proteómico, lo que indica la capacidad de la plataforma ABCD para identificar objetivos personalizados para el tratamiento. Al perfilar y agrupar la expresión de proteínas en las muestras de los pacientes, los inventores también mostraron el uso de la plataforma ABCD para monitorizar y predecir la respuesta al tratamiento en pacientes que reciben quimioterapia, por ejemplo, inhibidores de la quinasa. El análisis de proteínas determinado por la plataforma ABCD es escalable y puede extenderse para detectar otras moléculas diana, por ejemplo, metabolitos y lípidos. Por consiguiente, varios aspectos descritos en el presente documento proporcionan métodos, sistemas y kits para detectar y/o cuantificar una pluralidad de moléculas diana de una muestra, así como sus usos de las mismas en diversas aplicaciones, por ejemplo, diagnóstico, pronóstico, tratamiento personalizado y/o seguimiento del tratamiento.

Según la invención, se proporciona aquí un método para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra. El método comprende (a) poner en contacto una muestra con una composición que comprende una pluralidad de sondas diana, en donde cada sonda diana en la pluralidad comprende: (i) una molécula de unión a diana que se une específicamente a una molécula diana distinta en la muestra; (ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y (iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación; (b) separar las sondas diana no unidas de una pluralidad de complejos en la muestra, teniendo cada complejo una molécula diana y una sola sonda diana unida a la misma, en donde el complejo no tiene una segunda sonda diana que se une a una región diferente de la molécula diana; (c) liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de la pluralidad de complejos; (d) acoplar las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas de la etapa de liberación (c) a una composición de detección que comprende una pluralidad de sondas informadoras, en donde cada sonda informadora en la pluralidad comprende: una primera región específica de sonda diana que es capaz de unirse a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y una etiqueta detectable que identifica la sonda informadora, en la que la etiqueta crea una señal distinguible única para cada sonda informadora; y (e) detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas basándose en un método de electroforesis sin gel sin ningún paso de amplificación, en el que las señales son distinguibles para las secuencias de nucleótidos de identificación, identificando así las moléculas de unión a la diana correspondientes y detectando una pluralidad de diferentes moléculas diana en la muestra, y en donde la composición comprende además una pluralidad de sondas de control, en donde cada sonda de control en la pluralidad comprende una molécula de unión de control que se une específicamente a una molécula de control en la muestra; una secuencia de control de identificación que identifica la molécula de unión de control; y un enlazador escindible entre la molécula de unión de control y la secuencia de control de identificación.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible no se prehibrida (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases) a ninguna porción de las secuencias de nucleótidos identificadas.

Como tal, cada complejo que comprende una molécula diana y una sonda diana unida a la misma no requiere dos o más sondas diana de diferentes tipos unidas a la misma molécula diana, donde cada una de las sondas diana se une a una región diferente de la misma molécula diana. Por ejemplo, cada complejo no requiere tanto una primera sonda diana que se une a una primera región de una molécula diana, como una segunda sonda diana que se une a una segunda región de la misma molécula diana. Dicho de otra manera, una sola sonda diana como se describe en el presente documento que se une a una molécula diana es suficiente para permitir los métodos descritos en el presente documento. El método descrito en este documento no requiere que otra sonda diana se una a la misma molécula diana para unirse a un sustrato sólido (por ejemplo, una perla).

Las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas pueden detectarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a secuenciación, reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (PCR), multiplexado (PCR), citometría de masas, multiplexado inmunofluorescencia inactivado con fluoróforo, métodos basados en hibridación, métodos basados en hibridación fluorescente, imágenes y cualquier combinación de los mismos. Como se describe aquí, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas pueden determinarse por métodos basados en electroforesis. Sin embargo, según la invención, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas no se determinan por métodos basados en electroforesis.

Las señales de los respectivos marcadores detectables de las sondas informadoras que están acopladas a las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas se detectan en consecuencia. Dado que las señales son distinguibles para cada una de las sondas informadoras respectivas que están unidas a las secuencias de nucleótidos de identificación, las moléculas de unión a la diana pueden identificarse correspondientemente, detectando así una pluralidad de moléculas diana en la muestra.

En algunas realizaciones, el marcador detectable de las sondas informadoras puede comprender una o más moléculas marcadoras que crean una señal única para cada sonda informadora. Por ejemplo, una señal única puede ser una señal óptica. La señal óptica puede ser una señal emisora de luz o una serie o secuencia de señales emisoras de luz. En algunas realizaciones, las moléculas marcadoras para la generación de una señal óptica pueden comprender uno o una pluralidad de una unidad estructural fluorocromo, una unidad estructural fluorescente, una unidad estructural colorante, una unidad estructural quimioluminiscente o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la composición de detección utilizada en los métodos descritos en el presente documento puede comprender adicional o alternativamente una pluralidad de sondas de captura. Cada sonda de captura puede comprender (i) una segunda región específica de sonda diana que es capaz de unirse a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y (ii) una etiqueta de afinidad. La etiqueta de afinidad de la sonda de captura se usa generalmente para permitir la inmovilización de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, después del acoplamiento a la composición de detección, sobre una superficie de sustrato sólido. En algunas realizaciones, la inmovilización de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas puede proporcionar señales espaciales distinguibles que identifican las sondas de captura acopladas a las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas. Ejemplos de un sustrato sólido incluyen, entre otros, un dispositivo para microfluidos, un cartucho, una placa de microtitulación, un tubo y una matriz.

El método de detección en (d) no requiere la amplificación de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, la primera región específica de la sonda diana o la segunda región específica de la sonda diana. Los métodos de detección sin amplificación pueden minimizar cualquier desviación o error introducido durante la amplificación, por ejemplo, debido a las eficiencias de amplificación variables entre las secuencias de nucleótidos.

Como se describe en el presente documento, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana descritas en el presente documento pueden seleccionarse o diseñarse de manera que no reaccionen de forma cruzada con ninguna secuencia de ácidos nucleicos en un genoma de un sujeto, cuya muestra se está evaluando. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos de identificación utilizadas para detectar moléculas diana de la muestra de un sujeto pueden seleccionarse o diseñarse con base en secuencias de nucleótidos de una especie o género que es diferente del sujeto. Solo a modo de ejemplo, las secuencias de nucleótidos de identificación para uso en la muestra de un animal (por ejemplo, un mamífero tal como un humano) pueden derivarse de un genoma de planta. Como se describe en el presente documento, las secuencias de nucleótidos de identificación para uso en una muestra humana pueden derivarse de un genoma de patata. Como se describe en el presente documento, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener secuencias seleccionadas de la Tabla 2 (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 110), o un fragmento de la misma.

En general, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana pueden tener cualquier longitud de secuencia y pueden variar dependiendo de una serie de factores, que incluyen, entre otros, métodos de detección y/o el número de moléculas diana por detectar. Por ejemplo, la longitud de las secuencias de nucleótidos de identificación puede aumentar para proporcionar una identificación suficiente de un gran número de moléculas diana en una muestra. Como se describe en el presente documento, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener una longitud suficiente para proporcionar una unión fiable a sondas informadoras complementarias y generar señales detectables. Como se describe en el presente documento, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener una longitud de aproximadamente 30-100 nucleótidos. Como se describe en el presente documento, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener una longitud de aproximadamente 70 nucleótidos.

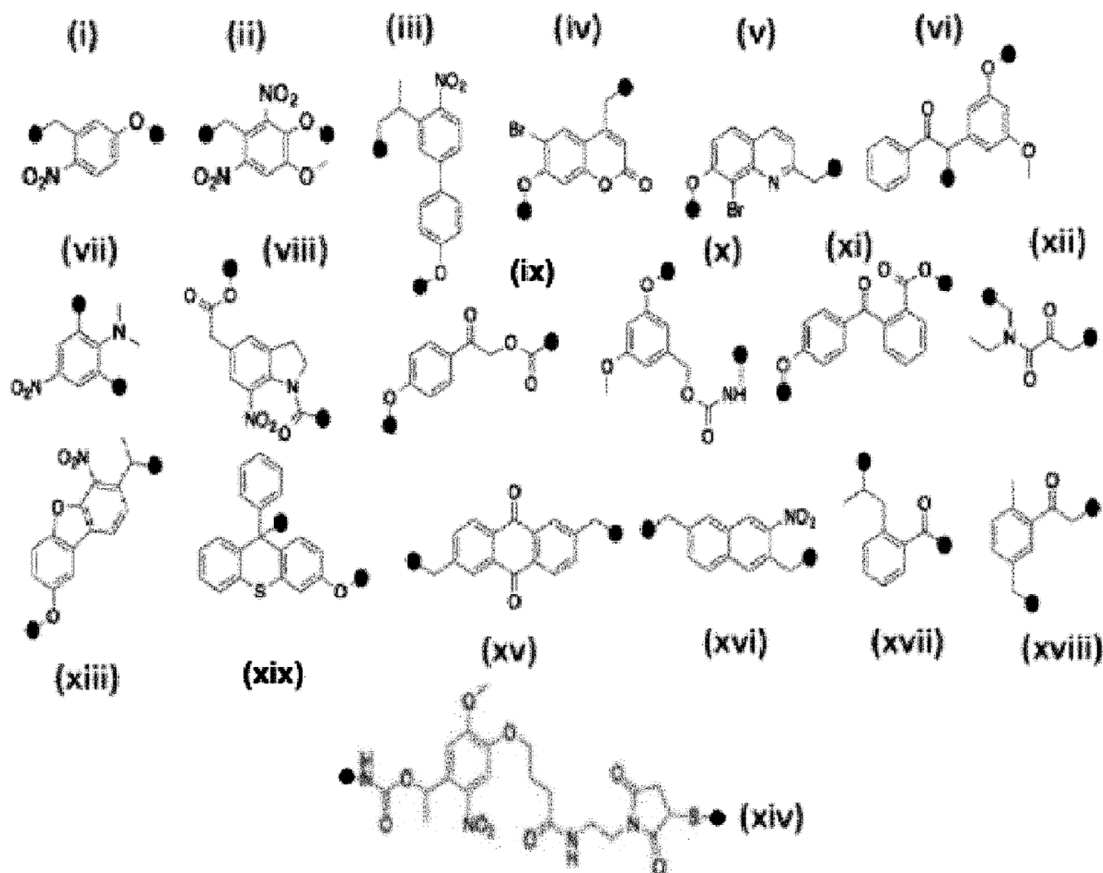
El enlazador escindible que acopla una molécula de unión a un objetivo a una secuencia de nucleótidos de identificación en una sonda diana puede permitir la liberación de la secuencia de nucleótidos de identificación de la sonda diana al unirse a una molécula diana de modo que la secuencia de nucleótidos de identificación liberada se pueda detectar. Los enlazadores escindibles son conocidos en la técnica, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, los que son sensibles a una enzima, pH, temperatura, luz, tensión de cizallamiento, sonicación, un agente químico (por ejemplo, ditiotreitolo) o cualquier combinación del mismo. En algunas realizaciones, el enlazador escindible puede ser sensible a la luz y a la degradación enzimática.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible no comprende una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos monocatenarios) que es complementaria (para el emparejamiento de bases) a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de identificación. Es decir, en estas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de identificación no se libera del complejo separándose de la secuencia de polinucleótidos complementaria acoplada a una molécula de unión a diana. Por consiguiente, en algunas realizaciones, una sonda diana comprende (i) una molécula de unión a diana que se une específicamente a la molécula diana presente en la muestra; (ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y (iii) un enlazador escindible no hibridable entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación.

Como se describe en el presente documento, los enlazadores escindibles, no hibridables, se pueden seleccionar del grupo que consiste en enlazadores hidrolizables, enlazadores escindibles redox, enlazadores escindibles a base de fosfato, enlazadores escindibles con ácido, enlazadores escindibles a base de éster, enlazadores escindibles a base de péptidos, enlazadores fotoescindibles y cualquier combinación de los mismos. Como se describe en el presente documento, el enlazador escindible puede comprender un enlace disulfuro, un grupo tetrazina-trans-cicloocteno, un grupo sulfhidrilo, un grupo nitrobenzilo, un grupo nitroindolina, un grupo bromo hidroxycumarina, un grupo bromo hidroxiquinolona, un grupo hidroxifenacilo, un grupo dimetozibenzoina, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible no hibridable puede comprender un enlazador fotoescindible. Se puede usar cualquier enlazador fotoescindible reconocido en la técnica para las sondas diana descritas en este documento. El enlazador fotoescindible de ejemplo se selecciona del grupo que consiste en las moléculas (i)-(xix) y

cualquier combinación de las mismas, en donde las estructuras químicas de las moléculas (i)-(xix) se muestran como sigue:



donde cada uno de los puntos negros en cada molécula representa un punto de conexión o acoplamiento que se conecta, directa o indirectamente, a una molécula de unión a la diana descrita en el presente documento o una secuencia de nucleótidos de identificación descrita en el presente documento. El punto de conexión puede ser un enlace, o comprender un átomo, una molécula y/o un enlazador descrito aquí.

Como se describe en el presente documento, el enlazador fotoescindible puede comprender la molécula (xiv).

En algunas realizaciones donde se usa un enlazador fotoescindible, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden liberarse de las sondas diana unidas exponiendo las sondas diana unidas a una luz de una longitud de onda especificada. En algunas realizaciones, la luz ultravioleta se puede usar para liberar secuencias de nucleótidos de identificación de sondas diana unidas.

Como se describe en el presente documento, el método puede comprender, además, antes de poner en contacto la muestra con sondas diana, separar las células diana de las células que interfieren en la muestra. En la muestra se conocen métodos para separar las células diana de las células interferentes, por ejemplo, con base en las proteínas de la superficie celular que distinguen las células diana de las células interferentes. Solo a modo de ejemplo, las células diana o las células interferentes pueden marcarse con ligandos que se dirigen a células específicas de interés (por ejemplo, anticuerpos específicos de células). Como se describe en el presente documento, donde los ligandos específicos de la célula están marcados fluorescentemente, las células marcadas pueden clasificarse, por ejemplo, por citometría de flujo. Alternativamente, si los ligandos específicos de la célula están unidos a partículas magnéticas, las células marcadas con partículas magnéticas unidas pueden aislarse de la muestra mediante separación magnética.

Las células diana pueden ser procariotas o eucariotas, incluidos microbios (por ejemplo, bacterias, hongos, virus y/o patógenos). Como se describe en el presente documento, las células diana pueden comprender células normales, células enfermas, células mutantes, células germinales, células somáticas, y/o células raras. Ejemplos de células raras incluyen, sin limitaciones, células tumorales circulantes, células fetales, células madre, células inmunes, células clonales y cualquier combinación de las mismas. Como se describe en el presente documento, las células diana pueden comprender células tumorales. Como se describe en el presente documento, las células tumorales pueden derivarse de una biopsia de tejido, un aspirado fino o una biopsia líquida (por ejemplo, peritoneal, pleural, líquido cefalorraquídeo y/o sangre), un intercambio de mucosa, una biopsia de piel, una muestra de heces o cualquier

combinación de los mismos. Como se describe en el presente documento, se pueden usar células completas y/o lisados celulares en los métodos y/o sistemas descritos en el presente documento para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra. Como se describe en el presente documento, las células completas se pueden obtener de una muestra fijada de células o tejidos.

- 5 Normalmente, las señales detectadas a partir de las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana correspondientes a las moléculas diana pueden compararse con una referencia de control para tener en cuenta cualquier unión no específica. Por consiguiente, la composición añadida a la muestra comprende además una pluralidad de sondas de control. Cada sonda de control en la pluralidad comprende: (i) una molécula de unión de control que se une específicamente a una molécula de control en la muestra; (ii) una secuencia de control de
- 10 identificación que identifica la molécula de unión de control; y (iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión de control y la secuencia de control de identificación. La molécula de unión de control puede unirse a una proteína de control presente en una muestra. Ejemplos no limitantes de proteínas de control incluyen proteínas de limpieza, isotipos de control IgG, proteínas mutantes no funcionales o no ligantes, y cualquier combinación de las mismas.
- 15 Las señales de las sondas de control se pueden usar para generar un umbral para las señales de las sondas diana. Por consiguiente, el método puede comprender además generar un umbral para las señales diana. Las señales diana se pueden restringir con base en la unión no específica. Como se describe en el presente documento, el umbral generalmente se establece para que sea mayor que el de las señales de la unión no específica. Como se describe en el presente documento, el umbral puede determinarse usando desviación estándar y error de medición de al menos una o más proteínas de control.
- 20 En algunas realizaciones, el método puede comprender además cuantificar las señales (por ejemplo, señales que están por encima del umbral predeterminado) normalizando las señales asociadas con las sondas diana mediante las señales asociadas con las sondas de control. Como se describe en el presente documento, las señales pueden ser cuantificadas y expresadas como el número de secuencias de nucleótidos de identificación detectadas por agente de unión a la diana.
- 25 Como se describe en el presente documento, el método puede comprender además extraer una molécula de ácido nucleico para la misma muestra para un análisis de ácidos nucleicos. Ejemplos de detección y análisis de ácidos nucleicos pueden incluir, entre otros, secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR), PCR multiplexada, secuenciación de ADN, secuenciación de ARN, secuenciación de novo, secuenciación de próxima generación, como secuenciación de firma masivamente paralela (MPSS), secuenciación de colonias, secuenciación por pirosecuenciación de Illumina (Solexa), secuenciación SOLiD, secuenciación de semiconductores iónicos,
- 30 secuenciación de nanobalas de ADN, secuenciación de una sola molécula de Heliscope, secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT), secuenciación de ADN por nanoporos, secuenciación por hibridación, secuenciación por espectrometría de masas, secuenciación de Sanger por microfluidos, técnicas de secuenciación basadas en microscopía, secuenciación de ARN polimerasa (RNAP) o cualquier combinación de las mismas.
- 35 Aunque los métodos descritos en el presente documento se describen en el contexto en donde las secuencias de nucleótidos de identificación se liberan de las sondas diana unidas antes de la detección, en algunos casos, las secuencias de nucleótidos de identificación no necesitan liberarse de las sondas diana unidas. Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento también pueden aplicarse cuando las secuencias de nucleótidos de identificación permanecen unidas a las sondas diana durante la detección.
- 40 Se pueden llevar a cabo diversas realizaciones de los métodos descritos en este documento en uno o más módulos funcionales en un sistema o un sistema informático como se describe en este documento. Por consiguiente, en este documento se describe un sistema para la detección multiplexada de una pluralidad de moléculas diana en una muestra. Por ejemplo, el sistema comprende:
- 45 (a) al menos un módulo de procesamiento de muestras que comprende instrucciones para recibir dicha al menos una muestra de prueba que comprende una muestra y una pluralidad de sondas diana, en donde cada sonda diana en la pluralidad comprende:
 - i) una molécula de unión a la diana que se une específicamente a una molécula diana en la muestra;
 - ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y
 - iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación; y
- 50 en donde el al menos un módulo de procesamiento de muestra comprende además instrucciones para liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana que están unidas a las moléculas diana en la muestra;
- (b) un módulo de detección de señal que comprende instrucciones para detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas;
- (c) al menos un módulo de almacenamiento de datos que comprende instrucciones para almacenar las señales detectadas de (b) e información asociada con secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana;
- 55

(d) al menos un módulo de análisis que comprende instrucciones para determinar la presencia de una o más moléculas diana en la muestra en función de las señales detectadas; y

5 (e) al menos un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en parte en la salida de análisis de dicho módulo de análisis, en donde el contenido comprende una señal indicativa de lo siguiente: (i) la presencia de una o más moléculas diana en la muestra, (ii) la ausencia de una o más moléculas diana en la muestra, y/o (iii) los niveles de expresión de una o más moléculas diana en la muestra.

10 En algunas realizaciones, el módulo de análisis puede comprender además instrucciones para (i) identificar las sondas detectables de las sondas informadoras que corresponden a las señales detectadas; (ii) identificar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana que corresponden a las sondas detectables con base en las primeras regiones específicas de la sonda diana de las sondas informadoras; y (iii) identificar las moléculas de unión a la diana que corresponden a las secuencias de nucleótidos de identificación, determinando así la presencia de una o más moléculas diana en la muestra.

15 En algunas realizaciones, el contenido puede mostrarse en una pantalla de ordenador, una pantalla, un monitor, un correo electrónico, un mensaje de texto, un sitio web, una impresión física (por ejemplo, papel), o proporcionarse como información almacenada en un dispositivo de almacenamiento de datos.

También se proporcionan aquí kits, por ejemplo, para la detección multiplexada de una pluralidad de moléculas diana diferentes de una muestra. El kit comprende:

(a) una pluralidad de sondas diana, en donde cada sonda diana en la pluralidad comprende:

20 i) una molécula de unión a la diana que se une específicamente a la molécula diana distinta en la muestra;
ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y
iii) un enlazador escindible, no hidrolizable entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación; y

(b) una pluralidad de sondas informadoras, en donde cada sonda informadora comprende:

25 i. una primera región específica de sonda diana que es capaz de unirse a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y
ii) una etiqueta detectable que identifica la sonda informadora; y

(c) pluralidad de sondas de captura, en donde cada sonda de captura comprende:

30 i. una segunda región específica de la sonda diana que es capaz de unirse a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y
ii. una etiqueta de afinidad para la inmovilización de la secuencia de nucleótidos de identificación en un sustrato sólido.

35 Como se describe en el presente documento, el marcador detectable de las sondas informadoras puede comprender una o más moléculas marcadoras que crean una señal única para cada sonda informadora. Una señal única de ejemplo puede ser una señal óptica. La señal óptica puede comprender una o una serie o una secuencia de señales emisoras de luz. En estas instancias, los ejemplos no limitantes de las moléculas marcadoras incluyen unidades estructurales fluorocromos, unidades estructurales fluorescentes, unidades estructurales colorantes, unidades estructurales quimioluminiscentes y cualquier combinación de los mismos.

Como se describe en el presente documento, el kit puede comprender además una pluralidad de sondas de control, en donde cada sonda de control en la pluralidad comprende:

40 (i) una molécula de unión de control que se une específicamente a una molécula de control en la muestra;
(ii) una secuencia de control de identificación que identifica la molécula de unión de control; y
(iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión de control y la secuencia de control de identificación.

45 Como se describe en el presente documento, el kit puede comprender además al menos un reactivo para uso en una o más realizaciones de los métodos o sistemas descritos en este documento. Los reactivos que se pueden proporcionar en el kit pueden incluir al menos uno o más de los siguientes: un reactivo de hibridación, un reactivo de purificación, un reactivo de inmovilización, un agente de formación de imágenes, un agente de permeabilización celular, un agente de bloqueo, un agente de escisión para el enlazador de escisión, cebadores para detección de ácidos nucleicos, polimerasa de ácidos nucleicos y cualquier combinación de los mismos.

Como se describe en el presente documento, el kit puede incluir además un dispositivo para uso en una o más realizaciones de los métodos y/o sistemas descritos en este documento. Como se describe en el presente documento,

el dispositivo puede comprender una superficie para la inmovilización de las sondas de captura tras el acoplamiento a las secuencias de nucleótidos de identificación. Como se describe en el presente documento, el dispositivo puede comprender un dispositivo para microfluidos para separar células diana de células interferentes como se describe en el presente documento.

Los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse para detectar cualquier molécula diana presente en una muestra, siempre que se usen agentes de unión a diana apropiados en las sondas diana empleadas en los métodos descritos en este documento. Las moléculas diana de ejemplo que pueden detectarse mediante los métodos, sistemas y kits descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, metabolitos, lípidos, carbohidratos, toxinas, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, células (por ejemplo, células eucariotas, procariotas células y microbios), y cualquier combinación de los mismos. Como se describe en el presente documento, las moléculas diana por detectar pueden ser moléculas extracelulares o secretadas. Como se describe en el presente documento, las moléculas diana por detectar pueden ser intracelulares, por ejemplo, moléculas citoplasmáticas o moléculas nucleares.

Para detectar moléculas intracelulares (por ejemplo, proteínas intracelulares), las células diana en la muestra pueden permeabilizarse o someterse a lisis de manera que las sondas diana puedan contactar las moléculas intracelulares objetivo para su posterior procesamiento y análisis.

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden permitir mediciones de al menos dos moléculas diana de diferentes tipos. Por ejemplo, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse para medir, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos y proteínas, o proteínas y metabolitos, o proteínas y lípidos. Las mediciones de al menos dos moléculas diana de diferentes tipos se pueden realizar de forma simultánea o secuencial. En otra realización, al liberar secuencias de nucleótidos de identificación de moléculas diana unidas (por ejemplo, proteínas), el material genético y las secuencias de nucleótidos de identificación se pueden extraer simultáneamente de una muestra única, permitiendo análisis de interrelaciones proteína-ADN-ARN.

A modo de ejemplo solamente, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento aplicados a una muestra pueden preservar materiales genéticos en una muestra mientras se detectan otros materiales diana no genéticos en la misma muestra. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento para la detección de moléculas diana no genéticas (por ejemplo, pero sin limitarse a proteínas) pueden usarse en combinación con un análisis de ácidos nucleicos para materiales genéticos, por ejemplo, para estudiar las moléculas diana no genéticas (por ejemplo, pero no limitadas a proteínas) que interactúan con materiales genéticos o elementos reguladores genéticos. En estas realizaciones, los métodos y sistemas descritos en el presente documento para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra como se describe en el presente documento pueden comprender además extraer una molécula de ácido nucleico de la misma muestra en la que se van a detectar moléculas diana. En algunas realizaciones, los métodos y sistemas descritos en el presente documento pueden comprender además someter la molécula de ácido nucleico extraída a un análisis de ácidos nucleicos. Se pueden usar diversos métodos para el análisis de ácidos nucleicos, que incluyen, entre otros, secuenciación, secuenciación de próxima generación, reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (PCR), PCR multiplexada, secuenciación de ADN, secuenciación de ARN, secuenciación de novo, secuenciación de próxima generación, como la secuenciación masiva de firma paralela (MPSS), secuenciación de colonia, secuenciación de pirosecuenciación, secuenciación de Illumina (Solexa), secuenciación SOLiD, secuenciación de semiconductores iónicos, secuenciación de ADN por nanoesfera, secuenciación de una sola molécula de Heliscope, secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT), secuenciación de ADN por nanoporos, secuenciación por hibridación, secuenciación con espectrometría de masas, secuenciación Sanger por microfluidos, técnicas de secuenciación basadas en microscopía, secuenciación de ARN polimerasa (RNAP), tecnología basada en hibridación de fluorescencia (por ejemplo, pero sin limitarse a la tecnología de hibridación nanoString nCounter®), cualquier método de detección de ácidos nucleicos reconocido en la técnica, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, después de que una muestra y/o moléculas diana no genéticas se hayan marcado con una pluralidad de sondas diana descritas aquí, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana se pueden liberar de las moléculas diana no genéticas unidas simultáneamente con extracción de moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) de la misma muestra marcada. En estas realizaciones, tanto las moléculas de ácidos nucleicos de interés como las secuencias de nucleótidos de identificación pueden detectarse simultáneamente en una mezcla de muestra única. En una realización, tanto las moléculas de ácidos nucleicos de interés como las secuencias de nucleótidos de identificación se pueden detectar simultáneamente en una mezcla de muestra única usando el sistema de análisis nanoString nCounter®, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 8,415,102. Otros métodos reconocidos en la técnica para el análisis de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento también se pueden usar para la detección simultánea de moléculas de ácidos nucleicos de interés (materiales genéticos de las células) y secuencias de nucleótidos de identificación liberadas de moléculas diana no genéticas unidas.

En realizaciones alternativas, las moléculas de ácidos nucleicos se pueden extraer de una primera porción de una muestra, mientras que las moléculas diana no genéticas se pueden derivar u obtener independientemente de una segunda porción de la misma muestra. En estas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos de interés y las moléculas diana no genéticas se pueden detectar por separado para determinar los niveles de expresión de las

moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) de interés y las moléculas diana no genéticas (por ejemplo, proteínas, pero sin limitación) en la misma muestra. Las moléculas de ácidos nucleicos de interés pueden someterse a cualquier análisis de ácidos nucleicos reconocido en la técnica, mientras que las moléculas diana no genéticas pueden detectarse mediante la detección e identificación de las secuencias de nucleótidos de identificación correspondientes liberadas de las sondas diana utilizando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento.

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden adaptarse para medir proteínas y moléculas de ácidos nucleicos en la misma muestra. Por ejemplo, las proteínas pueden detectarse mediante una o más realizaciones de las sondas diana descritas en este documento, mientras que las moléculas de ácidos nucleicos pueden detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica, creando así un perfil de expresión integrado para la muestra, que puede proporcionar información sobre la interacción entre las proteínas y las moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, elementos reguladores genéticos como los microARN.

Los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse en cualquier aplicación en la que sea deseable la detección de una pluralidad de moléculas diana en una muestra. Por ejemplo, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra de una fuente ambiental (por ejemplo, agua, suelo, productos alimenticios y/o estanques).

Los inventores han demostrado que, en una realización, un código de barras de anticuerpos con la plataforma de ADN fotoescindible (ABCD) descrita en el presente documento puede permitir el análisis de cientos de proteínas de una sola célula o un número limitado de células, por ejemplo, de aspirados de aguja fina mínimamente invasivos (FNA). En consecuencia, las muestras susceptibles de los métodos descritos en el presente documento pueden comprender menos de 500 células o menos. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra unicelular. En algunas realizaciones, la muestra puede comprender células aisladas de un aspirado con aguja fina.

Cuando la muestra es una muestra biológica, en algunas realizaciones, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse en un tratamiento personalizado. Por ejemplo, se puede recolectar una muestra biológica de un sujeto individual que necesita un tratamiento para una afección. Usando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento, se puede generar un perfil de expresión de moléculas diana asociadas con la condición del sujeto para identificar uno o más objetivos terapéuticos para el sujeto, identificando así un régimen de tratamiento para el sujeto.

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse para controlar la respuesta de un sujeto a un tratamiento para su afección. Por ejemplo, se pueden recolectar muestras biológicas del sujeto antes y/o durante el curso del tratamiento. Usando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento, se pueden generar perfiles de expresión de moléculas diana asociadas con la condición del sujeto antes y/o durante el curso del tratamiento para comparar y determinar cualquier cambio en los niveles de expresión de las moléculas diana en el sujeto, monitorizando así la respuesta al tratamiento en el sujeto.

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse para diagnosticar una afección en un sujeto. Por ejemplo, se puede recolectar una muestra biológica de un sujeto que está en riesgo de sufrir una afección. Usando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento, se puede generar un perfil de expresión de moléculas diana asociadas con la afección por diagnosticar para comparar con uno o más perfiles de expresión de referencia (por ejemplo, correspondiente a un sujeto sano normal y/o un sujeto que tiene la condición a ser diagnosticada), determinando así si el sujeto está en riesgo de la condición.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C muestra un esquema de ejemplo de un análisis de proteínas multiplexadas en células individuales de acuerdo con una o más realizaciones de los métodos descritos en este documento. (Figura 1A) Las células se cosecharon de pacientes con cáncer mediante FNA. En este caso, se muestra una población heterogénea de células cancerosas positivas para EpCAM (verde) junto con células mesoteliales (rojo) con núcleos mostrados en azul (Hoechst) de un FNA de cáncer abdominal. Las células cancerosas se enriquecieron y aislaron mediante separación magnética en dispositivos para microfluidos de polidimetilsiloxano (PDMS) con canales en espiga utilizando modos de selección positivos (por ejemplo, EpCAM+/CK+) y negativos (por ejemplo, CD45-). (Figura 1B) Las células de interés se incubaron con un cóctel de anticuerpos conjugados con ADN que contienen un enlazador fotoescindible (Figura 2A) para permitir la liberación de ADN después de la exposición a la luz ultravioleta. (Figura 1C) Los conjugados de ADN-anticuerpo liberados de las células lisadas (Figura 3) se aislaron mediante separación por tamaño y extracción de IgG. Los códigos de barras de ADN "extraterrestres" liberados se procesaron con una plataforma de código de barras de ADN fluorescente (NanoString). Los códigos de barras fluorescentes se hibridaron y se tomaron imágenes usando una cámara CCD. Los códigos de barras cuantificados se tradujeron a niveles de expresión de proteínas normalizando a ADN por anticuerpo y proteínas y restando la unión no específica de las IgG de control. Un perfil representativo de las líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3 muestra una alta expresión de CD44 y alta Her2, característica de esta línea celular.

Las Figuras 2A-2B muestran un esquema de ejemplo de conjugación ADN-anticuerpo. (Figura 2A) Se investigaron diversas estrategias de enlace para conjugar ADN con anticuerpos. En algunas realizaciones, se seleccionó el

enlazador fotoescindible (PCL) debido a su mejor eficacia de escisión en comparación con DTT, tetrazina-trans-cicloocteno (a través de química de clic, enlazador 1) y el reactivo de Traut (enlazador 2). La escisión del enlazador se probó midiendo el ADN liberado a través de la plataforma NanoString. Los datos son promedios de dos ensayos independientes. $**P < 0.01$, prueba t emparejada. (Figura 2B) Vinculación de ADN a un anticuerpo a través de la PCL. El enlazador se hizo reaccionar primero con los grupos amina ($-NH_2$) en el anticuerpo. Después de eliminar el exceso de molécula pequeña, se añadió ADN tiolado con un exceso de 10 veces a la mezcla de anticuerpo-enlazador. La primera de ADN-anticuerpo final se purificó mediante separación por tamaño y desplegamiento específico de IgG. Posteriormente, el ADN podría liberarse del anticuerpo por fotoescisión a una longitud de onda específica (365 nm).

La Figura 3 muestra datos experimentales dirigidos a la optimización de la lisis y los métodos de bloqueo. (Métodos A a D) Se utilizaron cuatro métodos diferentes de lisis y bloqueo para recuperar el ADN de las células marcadas. Las condiciones de lisado incluyeron: (Método A) regulador de lisis de proteinasa K+PKD; (Método B) regulador de lisis de proteinasa K+ATL; (Método C) regulador de lisis ATL solo; y (Método D) escisión por UV sola (sin lisis celular). Los recuentos de lisado se probaron por duplicado (eje x) midiendo la señal de ADN (eje y) y diferentes proteínas intracelulares (eje z). La mejor condición de reacción fue el método B (regulador de lisis de proteinasa K+ATL), con un aumento del 20% en la señal sobre los métodos (métodos A y C).

La Figura 4 es un gráfico que muestra las lecturas de ADN por anticuerpo para cada molécula diana. El número de fragmentos de ADN extraños por anticuerpo se midió mediante el método de NanoStrings (que se muestra en el gráfico) y se confirmó de forma independiente mediante la cuantificación de ADNss y la medición de la proteína Qubit. Los datos se muestran a partir de mediciones por triplicado \pm SEM.

La Figura 5 muestra un perfil de proteínas multiplexadas de una línea celular de cáncer de mama humano. Ejemplo representativo de 88 anticuerpos diferentes que abarcan vías relevantes para el cáncer (codificadas por color) perfiladas por triplicado (media \pm SEM) en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDAMB-231. Los recuentos de ADN se convirtieron en unión a proteínas normalizando a la cantidad de ADN por anticuerpo. La unión no específica de la expresión de seis IgG de control se sustrajo, y la expresión se normalizó mediante el mantenimiento de las proteínas Cox IV, histona H3, tubulina, actina y deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) (extremo derecho). AU, unidades arbitrarias; EMT, transición epitelial a mesenquimal.

Las Figuras 6A-6B son gráficos que muestran el efecto de los esquemas de permeabilización en el marcado de anticuerpos. (Figura 6A) La permeabilización del metanol y la saponina fueron similares para las proteínas intracelulares y nucleares. Se representan gráficamente ejemplos representativos, tales como fosfohistona H3 (pH3), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), Src fosforilada (pSRC) y glucógeno sintasa quinasa fosforilada β (pGSK3b). (Figura 6B) La unión inespecífica fue mucho mayor con la permeabilización de metanol.

Las Figuras 7A-7B son datos experimentales que muestran la comparación de anticuerpos no modificados con conjugados de ADN-anticuerpo. (Figura 7A) Los conjugados de anticuerpo-ADN muestran una buena correlación contra los anticuerpos nativos no conjugados, según lo determinado por citometría de flujo. Los experimentos se realizaron en múltiples líneas celulares. Se muestra un ejemplo representativo con una comparación cabeza a cabeza de múltiples anticuerpos en la línea celular humana SKOV3 ($R^2 = 0.92$). (Figura 7B) La expresión de proteínas detectada en diferentes lisados celulares mostró patrones de expresión similares, ya sea detectada por anticuerpos no modificados o conjugados de ADN. Esto fue válido para p53 y fosfo-S6RP (inmunotransferencia) y Ki67 (transferencia).

Las Figuras 8A-8C muestran datos de validación de conjugados de ADN-anticuerpo. (Figura 8A) Concordancia entre dos clones de anticuerpos diferentes de EpCAM (MOC-31 y 158206) cuando se conjugan para separar los códigos de barras de ADN. Los anticuerpos se analizaron en múltiples muestras de pacientes ($n=22$). (Figura 8B) La expresión de anticuerpos se midió cuando las líneas celulares se tiñeron con un solo anticuerpo en comparación con un cóctel (más de 80 anticuerpos). Los datos se obtuvieron de 5 anticuerpos (CD44, EGFR, 53BP1, p-S6RP, IgG de conejo) en 3 líneas celulares humanas diferentes (MDA-MB-231, MDA-MB-436 y A431). El experimento se repitió por duplicado y cada punto de datos corresponde a un marcador en una línea celular dada. Las medidas de expresión se calcularon mediante recuentos de ADN normalizados para el mismo número de células. (Figura 8C) Los cambios en la expresión del marcador antes y después del tratamiento se analizaron y cuantificaron utilizando el método de los Ejemplos (plataforma ABCD) y una pantalla de inmunofluorescencia independiente (se muestra un error estándar por triplicado biológico).

La Figura 9 es un conjunto de gráficos que muestran que la expresión del marcador de proteína se correlaciona con la citometría de flujo. Múltiples marcadores (CD44, Her2, EGFR, CA19-9, Keratin 7 y Muc 1) se seleccionaron a través de múltiples líneas celulares (SK-OV-3, ES-2, OVCA429, UCI-107, UCI-101, TOV-112D, TOV-21G y A2780). Cada punto de datos representa la expresión derivada de los recuentos de ADN de NanoString o la citometría de flujo para una línea celular particular. Los valores de expresión se normalizaron mediante el mantenimiento de las proteínas GAPDH, tubulina y actina. Se excluyeron las líneas celulares con mediciones inferiores a las del control negativo (anticuerpos IgG) en citometría de flujo o Nanostring. Estas mediciones se compararon con mediciones de citometría de flujo realizadas independientemente, que se calcularon a partir de la intensidad de fluorescencia media (señal/fondo), donde el fondo era el anticuerpo secundario sin el anticuerpo primario. El recuadro muestra el gráfico log-log de los datos.

Las Figuras 10A-10C son datos experimentales sobre la sensibilidad de detección utilizando una línea celular de cáncer epidérmico humano. (Figura 10A) Una muestra a granel de 500.000 células de la línea celular de carcinoma epidermoide A431 se lisó y procesó como se muestra en las Figuras 1A-1C. Las diluciones correspondientes a 5, 15 y 50 células se compararon luego con la medición en masa. (Figura 10B) Los valores de correlación para las células A431 individuales seleccionadas por micromanipulación se comparan con las mediciones en masa (500.000 células). (Figura 10C) Perfiles de expresión de proteínas (valores de expresión \log_2) de cuatro células individuales en comparación con la muestra en masa. Las correlaciones fueron altamente significativas cuando se compararon todas las células individuales con las mediciones en masa ($P < .0001$, prueba t pareada; GraphPad Prism 6.0).

Las Figuras 11A-11B son datos experimentales que muestran la variabilidad unicelular en células A431 tratadas y no tratadas. (Figura 11A) Las mediciones de células individuales en líneas celulares A431 humanas que se trataron o no con el inhibidor de EGFR gefitinib se agruparon según una métrica de correlación (MatLab). (Figura 11B) Se muestran las pruebas t por pares para cuatro marcadores ($FDR = 0.1$, *** $P < 0.001$, GraphPad Prism). Se muestran los marcadores que fueron más significativos, así como el EGFR de fósforo, que es el objetivo principal de la inhibición de gefitinib. Se muestra la distribución entre las señales de las células no tratadas (azul) y las células tratadas (amarillo). Cada punto representa los niveles de expresión calculados a partir de una sola celda, y la media y la desviación estándar se muestran en el diagrama de caja.

Las Figuras 12A-12B muestran datos experimentales basados en un análisis de proteínas unicelulares en una muestra de paciente. Se obtuvo una FNA de un paciente con adenocarcinoma de pulmón probado por biopsia. (Figura 12A) Once células recolectadas se analizaron individualmente, y los niveles de expresión de proteínas en cada célula (eje y) se correlacionaron con los niveles de expresión de la muestra de tumor en masa (eje x). Cada punto de datos representa la expresión de un marcador dado ($n = 85$ marcadores, 3 por debajo del umbral de detección). (Figura 12B) Valores del coeficiente de correlación de Spearman R para cada una de las celdas individuales en (Figura 12A) entre sí y con la medición en masa.

La Figura 13 muestra la heterogeneidad interpaciente en el cáncer de pulmón. Se obtuvieron FNA de seis pacientes con adenocarcinoma de pulmón comprobado mediante biopsia, y se procesaron muestras a granel (~100 células cada una) como se muestra en las Figuras 1A-1C con 88 anticuerpos con código de barras. Los datos de expresión se normalizaron \log_2 por fila para mostrar diferencias entre cada paciente. Los perfiles de expresión fueron heterogéneos a pesar del tipo histológico idéntico: tras el análisis genético, los pacientes 1 y 2 tenían amplificación EGFR exón 19 y mutaciones T790M, el paciente 3 tenía una mutación EGFR exón 20, el paciente 4 tenía una mutación EGFR L858R y una mutación BRAF adicional, paciente 5 tuvieron una mutación KRAS, y el paciente 6 tuvo una translocación EML4-ALK.

Las Figuras 14A-14B muestran datos experimentales sobre el efecto de diferentes terapias en los perfiles de expresión de proteínas en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-436. (Figura 14A) Las células MDA-MB-436 se trataron con diferentes agentes y se midieron las proteínas marcadoras. Agrupación jerárquica no supervisada basada en tratamientos farmacológicos agrupados a distancia euclidiana por sus mecanismos de acción (objetivo molecular frente a daño del ADN) y objetivos primarios [EGFR para gefitinib/cetuximab y objetivo mamífero de rapamicina (mTOR)/PI3K para PIK-587]. Los datos muestran el cambio \log_2 veces de la expresión del marcador en células tratadas en comparación con las no tratadas para $n=84$ marcadores. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. (Figura 14B) Correlacionando la sensibilidad al fármaco de cuatro líneas celulares diferentes con cambios en el perfil proteómico después del tratamiento con cisplatino y olaparib. Los valores de IC_{50} (barras negras) se calcularon sobre la base de curvas de viabilidad (Figura 15A). El cambio del perfil celular después del tratamiento está representado por el número de marcadores significativos (barras grises) que se identificaron mediante una prueba t por pares de muestras tratadas versus no tratadas ($FDR = 0.1$).

Las Figuras 15A-15E son gráficos que muestran cambios en los marcadores de proteínas correlacionados con la sensibilidad a los medicamentos. Las líneas celulares de carcinoma de ovario humano (A2780, OVCAR429) y cáncer de mama (MDA-MB-436, MDA-MB-231) reaccionan de manera diferente a la quimioterapia. Se espera que aquellos con mayor sensibilidad a un medicamento muestren un mayor grado de cambio en sus perfiles celulares. (Figura 15A) La sensibilidad se determinó mediante valores de IC_{50} calculados a partir de las curvas de viabilidad de MTS en triplicado biológico para cada línea celular como se muestra. Los valores exactos y el ajuste de las curvas de viabilidad se determinaron mediante GraphPad Prism 5.0 (curva dosis-respuesta). (Figura 15B) Datos de un estudio de control donde las líneas celulares fueron tratadas con cetuximab, lo que resultó en la inhibición del fármaco. (Figuras 15C-15E) Cambios en un panel seleccionado de varios marcadores de daño de ADN (pH2A.X, Ku80, pChk2, pChk1), marcadores de apoptosis (PARP escindido, caspasa escindida 7) y otros mecanismos comúnmente asociados con el tratamiento con platino (pERK Bim). Los datos son medias \pm SEM, realizadas por triplicado.

Las Figuras 16A-16D muestran que el tratamiento con taxol y las pantallas de respuesta a la dosis en células HT1080 humanas in vitro. (Figura 16A) Los cambios de marcador seleccionados del tratamiento con taxol de respuesta a la dosis se muestran con perfiles de código de barras de ADN con error estándar de duplicado biológico. (Figura 16B) Los valores de EC_{50} de las curvas de respuesta a la dosis se muestran junto con los valores de R^2 . (Figura 16C) Se mostró que los marcadores que diferían significativamente de los no tratados (prueba t múltiple por pares, $FDR = 0.2$) tenían una respuesta dependiente de la dosis al tratamiento con taxol. (Figura 16D) Los marcadores que difieren

significativamente entre las condiciones no tratadas y tratadas se muestran en un diagrama de Venn. CDCP1 fue significativamente diferente en todas las dosis.

Las Figuras 17A-17B muestran perfiles de expresión de varios pacientes con cáncer para controlar y predecir la respuesta al tratamiento en pacientes que reciben inhibidores de PI3K. (Figura 17A) Los perfiles de cinco pacientes con cáncer sin tratamiento farmacológico se muestran con agrupamiento basado en métricas de correlación con enlace ponderado. El cuadro de puntos muestra el clúster que incluye el marcador que mejor separó a los respondedores y no respondedores (H3K79me2). Otros marcadores en el grupo incluyen pS6RP (un objetivo aguas abajo de PI3K), pH2A.X (marcador de daño de ADN), PARP (proteína de reparación de ADN) y 4EBP1 (traducción de proteínas). (Figura 17B) Cuatro pacientes con adenocarcinoma probado con biopsia fueron tratados con PI3Ki, y los cánceres primarios fueron sometidos a biopsia antes y después del tratamiento. El mapa de calor es un mapa de diferencias antes y después del tratamiento que muestra cambios \log_2 veces en la expresión de proteínas (normalizados por fila para resaltar las diferencias entre los pacientes). La segregación del paciente es por distancia métrica de correlación (enlace ponderado). El paciente en la tercera columna recibió una dosis más alta de PI3Ki (400 mg, dos veces al día) que el paciente en la cuarta columna (150 mg, dos veces al día).

Las Figuras 18A-18B son diagramas de bloques que muestran sistemas de ejemplo para uso en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, para la detección multiplexada de moléculas diana en una muestra.

Descripción detallada

Los diagnósticos clínicos basados en inmunohistoquímica generalmente requieren biopsias centrales invasivas y usan un número limitado de manchas de proteínas para identificar y clasificar los cánceres. Los aspirados de aguja fina (FNA) emplean agujas delgadas para obtener células de masas tumorales y, por lo tanto, el procedimiento es mínimamente invasivo. Si bien los FNA pueden dar una visión tremenda de la malignidad, el número de células en los FNA es tan pequeño (en comparación con la biopsia central) que las tecnologías actuales para el análisis de proteínas, como la inmunohistoquímica, son insuficientes. Las realizaciones de varios aspectos descritos en este documento se basan, en parte, en el desarrollo de un método escalable que no solo permite el análisis de una pluralidad de proteínas de una cantidad limitada de muestra, por ejemplo, FNA, sino que también preserva el material genético de la misma muestra para permitir mediciones simultáneas de proteínas y materiales genéticos (por ejemplo, ADN, ARN, epigenética y microARN). En una realización, el método se basa en la detección de anticuerpos con código de barras de ADN, donde los códigos de barras, cadenas simples de ADN, pueden fotoescindirse y detectarse usando sondas fluorescentes complementarias sin ninguna etapa de amplificación, y se conoce como un código de barras de anticuerpos con ADN fotoescindible (ABCD) plataforma en este documento. A diferencia del método de detección de proteínas descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2011/0086774, el código de barras de ADN y el anticuerpo que desarrollaron los inventores se acoplan entre sí a través de un enlazador no hibridable escindible, no un enlace hibridable que se hibrida de forma reversible (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases) a una parte del código de barras de ADN. Además, la detección de una proteína objetivo se basa en la unión de un único anticuerpo con código de barras de ADN a la proteína objetivo, que es diferente del método de detección de proteínas descrito en la Publicación de Solicitud Patente de los Estados Unidos No. US 2011/0086774, donde se requieren dos anticuerpos (uno para la inmovilización de un sustrato sólido, por ejemplo, una perla y otro para fines de detección) para la unión a diferentes regiones de la proteína diana.

Para demostrar la capacidad de la plataforma ABCD, los inventores aislaron células cancerosas dentro de los FNA de pacientes y expusieron estas células a una mezcla de aproximadamente 90 anticuerpos con código de barras de ADN, que cubren los procesos distintivos en cáncer (por ejemplo, apoptosis y daño en el ADN). Los inventores descubrieron que el análisis de proteínas unicelulares de los FNA de los pacientes mostró una alta heterogeneidad intratumoral, lo que indica la capacidad de la plataforma ABCD para realizar perfiles de proteínas en células individuales raras, incluidas, entre otras, células tumorales circulantes. Además, los inventores descubrieron que los pacientes que mostraban una histopatología idéntica mostraban heterogeneidad del paciente en el perfil proteómico, lo que indica la capacidad de la plataforma ABCD para identificar objetivos personalizados para el tratamiento. Al perfilar y agrupar la expresión de proteínas en las muestras de los pacientes, los inventores también mostraron el uso de la plataforma ABCD para monitorizar y predecir la respuesta al tratamiento en pacientes que reciben quimioterapia, por ejemplo, inhibidores de la quinasa. La plataforma ABCD para generar un perfil de proteínas es escalable y puede ampliarse para detectar otras moléculas diana, por ejemplo, metabolitos y lípidos. La plataforma ABCD no solo puede medir proteínas cuantitativamente, sino que la plataforma ABCD también puede permitir mediciones simultáneas de al menos 90 proteínas diferentes o más (por ejemplo, aproximadamente 100-200 proteínas diferentes) en una sola muestra. Además, debido a la alta sensibilidad de la plataforma ABCD, la plataforma ABCD puede permitir la detección de proteínas raras, por ejemplo, proteínas que generalmente no están altamente expresadas, o que no son fácilmente accesibles o extraídas, como las proteínas intracelulares. Por consiguiente, en este documento se describen métodos, sistemas y kits para detectar y/o cuantificar una pluralidad de moléculas diana de una muestra, así como sus usos de las mismas en diversas aplicaciones, por ejemplo, diagnóstico, pronóstico, tratamiento personalizado y/o monitorización del tratamiento.

Métodos para detectar o cuantificar una pluralidad de moléculas diana en una muestra

Se describe aquí un método para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra. El método comprende (a) poner en contacto una muestra con una composición que comprende una pluralidad de sondas diana, en donde cada sonda diana en la pluralidad comprende: (i) una molécula de unión a diana que se une específicamente a una molécula diana o una molécula diana distinta en la muestra; (ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que
5 identifica la molécula de unión a la diana; y (iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación; (b) liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana unidas; y (c) detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, en donde las señales son distinguibles para las secuencias de nucleótidos de identificación, identificando así las moléculas de unión a dianas correspondientes y detectando una pluralidad de moléculas diana en la muestra.

10 En algunas realizaciones en las que cada sonda diana de la pluralidad se une a una molécula diana distinta, no hay dos sondas diana en la pluralidad que se unan a diferentes regiones de la misma molécula diana.

Dicho de otra manera, el método comprende: (a) formar una pluralidad de complejos en una muestra, comprendiendo cada complejo una molécula diana y una sonda diana unida a la misma, en donde la sonda diana comprende (i) una molécula de unión a la diana que se une específicamente a la molécula diana presente en la muestra; (ii) una secuencia
15 de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y (iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación; (b) liberar las secuencias de nucleótidos de identificación del complejo; y (c) detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, en donde las señales son distinguibles para las secuencias de nucleótidos de identificación, identificando así las moléculas de unión a la diana correspondientes y detectando una pluralidad de moléculas diana en la muestra. En
20 algunas realizaciones, el enlazador escindible no se prehibrida (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases) con ninguna porción de las secuencias de nucleótidos identificadas.

En algunas realizaciones, por ejemplo, ensayo celular, cada complejo que comprende una molécula diana y una sonda diana unida al mismo no requiere dos o más sondas diana de diferentes tipos unidas a la misma molécula diana, donde cada una de las sondas diana se une a una región diferente de la misma molécula diana. Por ejemplo, a
25 diferencia del método de detección de proteínas descrito en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2011/0086774, cada complejo descrito aquí no requiere una primera sonda diana que se una a una primera región de una molécula diana, y una segunda sonda diana que se una a una segunda región de la misma molécula diana. Dicho de otra manera, en algunas realizaciones, una sola sonda diana como se describe en el presente documento que se une a una molécula diana es suficiente para permitir los métodos descritos en el presente documento. En estas
30 realizaciones, el método descrito en este documento no requiere que otra sonda diana se una a la misma molécula diana para unirse a un sustrato sólido (por ejemplo, una cuenta), por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2011/0086774.

En diversas realizaciones de diferentes aspectos descritos en este documento, el enlazador escindible no comprende una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos monocatenarios) que es
35 complementaria (para el emparejamiento de bases) al menos a una porción de la secuencia de nucleótidos de identificación. Es decir, en estas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de identificación no se libera del complejo separándose de la secuencia de polinucleótidos complementaria acoplada a una molécula de unión a diana. Por consiguiente, en algunas realizaciones, una sonda diana comprende (i) una molécula de unión a diana que se une específicamente a la molécula diana presente en la muestra; (ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que
40 identifica la molécula de unión a la diana; y (iii) un enlazador escindible no hibridable entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación.

Las "sondas diana" se describen en detalle en la siguiente sección "Sondas diana".

En algunas realizaciones, el método puede comprender además separar las sondas diana no unidas de las sondas diana que están unidas a las moléculas diana en la muestra.

45 Como se usa en el presente documento, el término "sondas diana unidas" se refiere a sondas diana que se unen a moléculas diana en una muestra.

En algunas realizaciones, el método puede comprender, además, antes de poner en contacto la muestra con sondas diana, separar las células diana de las células que interfieren en la muestra. En la muestra se conocen métodos para separar las células diana de las células interferentes, por ejemplo, con base en las proteínas de la superficie celular
50 que distinguen las células diana de las células interferentes. Solo a modo de ejemplo, las células diana o las células interferentes pueden marcarse con ligandos que se dirigen a células específicas de interés (por ejemplo, anticuerpos específicos de células). En algunas realizaciones donde los ligandos específicos de la célula están marcados fluorescentemente, las células marcadas pueden clasificarse, por ejemplo, por citometría de flujo. Alternativamente, si los ligandos específicos de la célula están unidos a partículas magnéticas, las células marcadas con partículas
55 magnéticas unidas pueden aislarse de la muestra mediante separación magnética. En algunas realizaciones, la clasificación o selección de células puede realizarse en un dispositivo para microfluidos. En algunas realizaciones, los métodos para aislar células diana o células interferentes de una muestra como se describe en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2013/078332 se puede usar en combinación con los métodos descritos aquí.

Las células diana pueden ser procariotas o eucariotas (incluyendo microbios tales como bacterias, hongos, virus y/o patógenos). En algunas realizaciones, las células diana pueden comprender células normales, células enfermas, células mutantes, células germinales, células somáticas y/o células raras. Ejemplos de células raras incluyen, sin limitaciones, células tumorales circulantes, células fetales, células madre, células inmunes, células clonales y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las células diana pueden comprender células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales pueden derivarse de una biopsia de tejido, un aspirado fino o una biopsia líquida (por ejemplo, peritoneal, pleural, líquido cefalorraquídeo y/o sangre), un intercambio de mucosa, una biopsia de piel, una muestra de heces, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las células completas y/o los lisados celulares pueden analizarse mediante los métodos descritos en el presente documento para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra. En algunas realizaciones, las células completas se pueden obtener de una muestra fijada de células o tejidos.

Las moléculas diana de ejemplo que se pueden detectar mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, metabolitos, lípidos, carbohidratos, toxinas, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, células y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las moléculas diana por detectar pueden ser moléculas extracelulares o secretadas. En algunas realizaciones, las moléculas diana por detectar pueden ser intracelulares, por ejemplo, moléculas citoplasmáticas o moléculas nucleares.

Para detectar moléculas intracelulares (por ejemplo, proteínas intracelulares), las células diana en la muestra pueden permeabilizarse o someterse a lisis (por ejemplo, con un regulador de lisis o un tensioactivo) de modo que las sondas diana puedan contactar las moléculas intracelulares diana para su posterior procesamiento y análisis. En algunas realizaciones, el regulador de lisis puede comprender una proteasa. Una proteasa de ejemplo es una proteasa K.

Las secuencias de nucleótidos de identificación pueden liberarse de las sondas diana unidas usando cualquier método conocido en la técnica, dependiendo de los tipos de los enlazadores escindibles. En algunas realizaciones, el enlazador escindible no comprende una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos monocatenarios) que es complementaria (para el emparejamiento de bases) a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de identificación. Es decir, en estas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de identificación no se libera del complejo mediante la separación de la secuencia de polinucleótidos complementaria (enlazador hibridable) acoplada a una molécula de unión a diana. Los enlazadores no hibridables escindibles son conocidos en la técnica, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a los que son sensibles a una enzima, pH, temperatura, luz, tensión de cizallamiento, sonicación, un agente químico (por ejemplo, ditiotreitól), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el enlazador escindible puede ser sensible a la luz y a la degradación enzimática.

En algunas realizaciones donde se usa un enlazador fotoescindible, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden liberarse de las sondas diana unidas exponiendo las sondas diana unidas a una luz de una longitud de onda especificada. En algunas realizaciones, la luz ultravioleta se puede usar para liberar secuencias de nucleótidos de identificación de sondas diana unidas.

Las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas se pueden detectar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación, reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (PCR), multiplexado (PCR), citometría de masas, inmunofluorescencia multiplexada inactivada con fluoróforo, métodos basados en hibridación, métodos basados en hibridación fluorescente, imágenes y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas pueden determinarse por métodos basados en electroforesis. En algunas realizaciones, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas no se determinan por métodos basados en electroforesis. Los métodos basados en electroforesis en gel generalmente no son tan cuantitativos o sensibles como otros métodos de detección descritos aquí, como PCR, métodos basados en hibridación por fluorescencia y tecnología de hibridación nanoString nCounter®, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 8,415,102, y Geiss et al. Nature Biotechnology. 2008. 26(3): 317-325. Por lo tanto, los métodos basados en electroforesis en gel no necesariamente han requerido sensibilidad para la detección de proteínas raras, por ejemplo, proteínas que generalmente no están altamente expresadas, o que no son fácilmente accesibles o extraídas, como las proteínas intracelulares. Además, la resolución de tamaño limitado en geles puede limitar las mediciones simultáneas de un gran número (por ejemplo, más de 5 o más de 10) de diferentes moléculas diana, en comparación con otros métodos de detección descritos en este documento, como PCR, métodos basados en hibridación de fluorescencia, y la tecnología de hibridación nanoString nCounter®, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 8,415,102, y Geiss et al. Nature Biotechnology. 2008. 26(3): 317-325.

La naturaleza de las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas puede variar con la elección de los métodos de detección y/o marcadores detectables. En algunas realizaciones, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas pueden detectarse mediante métodos basados en hibridación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método puede comprender además, antes de detectar las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, acoplar las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas a una composición de detección que comprende una pluralidad de sondas informadoras. Cada sonda informadora de la pluralidad puede comprender (i) una primera región específica de la sonda diana que es capaz de unirse a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y (ii) una etiqueta detectable que identifica la sonda informadora. En estas realizaciones, las señales de los respectivos marcadores detectables de las sondas

informadoras que están acopladas a las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas pueden detectarse en consecuencia. Dado que las señales son distinguibles para cada una de las sondas informadoras respectivas que están unidas a las secuencias de nucleótidos de identificación, las moléculas de unión a la diana pueden identificarse correspondientemente, detectando así una pluralidad de moléculas diana en la muestra. Se encontrará información adicional de "sondas informadoras" en la siguiente sección "Sondas informadoras".

En algunas realizaciones, la composición de detección utilizada en los métodos descritos en el presente documento puede comprender adicionalmente una pluralidad de sondas de captura como se describe en el presente documento. Se encontrará información adicional de las sondas de captura en la sección "Sondas de captura" a continuación.

En algunas realizaciones, el método seleccionado para detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas no requiere la amplificación de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, la primera región específica de la sonda diana o la segunda región específica de la sonda diana. Los métodos de detección sin amplificación pueden minimizar cualquier sesgo o error introducido durante la amplificación, por ejemplo, debido a las eficiencias de amplificación variables entre las secuencias de nucleótidos.

En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación se pueden detectar mediante la tecnología de hibridación nanoString nCounter®, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 8,415,102, y Geiss et al. Nature Biotechnology. 2008. 26(3): 317-325.

Normalmente, las señales detectadas a partir de las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana correspondientes a las moléculas diana pueden compararse con una referencia de control para tener en cuenta cualquier unión no específica. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la composición añadida a la muestra puede comprender además una pluralidad de sondas de control. Cada sonda de control en la pluralidad puede comprender: (i) una molécula de unión de control que se une específicamente a una molécula de control en la muestra; (ii) una secuencia de control de identificación que identifica la molécula de unión de control; y (iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión de control y la secuencia de control de identificación. La molécula de unión de control puede unirse a una proteína de control presente en una muestra. Ejemplos no limitantes de proteínas de control incluyen proteínas de limpieza, isotipos de control IgG, proteínas mutantes no funcionales o no ligantes, y cualquier combinación de las mismas.

Las señales de las sondas de control se pueden usar para generar un umbral para las señales de las sondas diana. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método puede comprender además generar un umbral para las señales diana. En algunas realizaciones, las señales diana se pueden restringir con base en la unión no específica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el umbral se puede determinar usando desviación estándar y error de medición de al menos una o más proteínas de control. El umbral generalmente se establece para ser mayor que el de las señales de la unión no específica. En algunas realizaciones, el umbral puede ser al menos 50% o más (incluyendo, por ejemplo, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o más) mayor que ese de las señales de la unión no específica. En algunas realizaciones, el umbral puede ser al menos 1.1 veces o más (incluyendo, por ejemplo, al menos 1.2 veces, al menos 1.3 veces, al menos 1.4 veces, al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, o superior) mayor que el de las señales de la unión no específica.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además cuantificar las señales (por ejemplo, señales que están por encima del umbral predeterminado) normalizando las señales asociadas con las sondas diana mediante las señales asociadas con las sondas de control. En algunas realizaciones, las señales pueden analizarse y expresarse como número de secuencias de nucleótidos de identificación por molécula de unión a la diana (o molécula diana).

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden complementar otras técnicas proteómicas de células individuales reconocidas en la técnica. Las técnicas proteómicas de células individuales de ejemplo incluyen, por ejemplo, citometría de masas e inmunofluorescencia multiplexada inactivada con fluoróforo. Véase, por ejemplo, Bendall et al. Science 332, 687-696 (2011) y Gerdes et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 11982-11987 (2013) para obtener información adicional sobre la citometría de masa de células individuales y la inmunofluorescencia multiplexada inactivada con fluoróforo.

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden permitir mediciones de al menos dos moléculas diana de diferentes tipos. Por ejemplo, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse para medir, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos y proteínas, o proteínas y metabolitos, o proteínas y lípidos. Las mediciones de al menos dos moléculas diana de diferentes tipos se pueden realizar de forma simultánea o secuencial.

A modo de ejemplo solamente, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento aplicados a una muestra pueden preservar materiales genéticos en una muestra mientras se detectan otros materiales diana no genéticos en la misma muestra. Esta es una de las ventajas sobre los métodos de análisis no genéticos (por ejemplo, proteómicos) existentes, como la citometría de flujo y la citometría de masas, que generalmente requieren una célula completa para medir moléculas diana no genéticas (por ejemplo, pero sin limitarse a proteínas). En consecuencia, siguiendo las mediciones no genéticas (por ejemplo, proteómicas), se pierde toda la célula, incluido su material genético. En la citometría de flujo, la célula se pierde a medida que atraviesa la cámara de flujo para detectar fluorescencia; En

citometría de masas, la muestra celular se vaporiza, destruyendo cualquier material genético que pueda estar disponible. La vaporización celular en la citometría de masas da como resultado la destrucción de ~60% de la muestra incluso para la detección proteómica, y mucho menos para la recuperación de material genético.

Por el contrario, los métodos y/o sistemas presentados aquí emplean una secuencia de nucleótidos de identificación (que comprende nucleótidos) como una etiqueta o código de barras para etiquetar y/o medir moléculas diana no genéticas (por ejemplo, pero sin limitarse a proteínas). Por lo tanto, los métodos y/o sistemas descritos en este documento aseguran que cualquier material que contenga nucleótidos (por ejemplo, secuencias de nucleótidos de identificación e incluso material genético extraído de las células) no se destruirá. Como tal, en una realización, los métodos para realizar mediciones simultáneas en las secuencias de nucleótidos de identificación (códigos de barras para la identificación de moléculas diana no genéticas, por ejemplo, pero sin limitarse a proteínas), así como el material genético de interés de las células (incluyendo, pero sin limitarse a ADN, ARN, microARN, ARN largos no codificantes, etc.) son esencialmente los mismos, excepto que el conjunto de sondas complementarias (que comprende sondas informadoras y opcionalmente sondas de captura) debe expandirse para detectar no solo las secuencias de nucleótidos de identificación para medir las moléculas diana no genéticas (por ejemplo, pero sin limitarse a proteínas), pero también los materiales genéticos (por ejemplo, pero sin limitarse a ADN/ARN) de las células.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento para la detección de moléculas diana no genéticas (por ejemplo, pero sin limitarse a proteínas) pueden usarse en combinación con un análisis de ácidos nucleicos para materiales genéticos, por ejemplo, para estudiar las moléculas diana no genéticas (por ejemplo, pero no limitadas a proteínas) que interactúan con materiales genéticos o elementos reguladores genéticos. En estas realizaciones, los métodos y sistemas descritos en el presente documento para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra como se describe en el presente documento pueden comprender además extraer una molécula de ácido nucleico de la misma muestra en la que se van a detectar moléculas diana. En algunas realizaciones, los métodos y sistemas descritos en el presente documento pueden comprender además someter la molécula de ácido nucleico extraída a un análisis de ácidos nucleicos. Se pueden usar diversos métodos para el análisis de ácidos nucleicos, que incluyen, entre otros, secuenciación, secuenciación de próxima generación, reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (PCR), multiplexación (PCR), secuenciación de ADN, secuenciación de ARN, secuenciación de novo, secuenciación de próxima generación como secuenciación de firma masivamente paralela (MPSS), secuenciación de colonia, secuenciación por pirocálisis, secuenciación Illumina (Solexa), secuenciación SOLiD, secuenciación de semiconductores iónicos, secuenciación de nanobalas de ADN, secuenciación de una sola molécula de Heliscope, secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT), secuenciación de ADN por nanoporos, secuenciación por hibridación, secuenciación con espectrometría de masas, secuenciación Sanger por microfluidos, técnicas de secuenciación basadas en microscopía, secuenciación de ARN polimerasa (RNAP), tecnología basada en hibridación de fluorescencia (por ejemplo, pero sin limitarse a la tecnología nanoString nCounter®), cualquier detección de ácidos nucleicos reconocida en el arte métodos, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, después de que una muestra y/o moléculas diana no genéticas se hayan marcado con una pluralidad de sondas diana descritas aquí, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana se pueden liberar de las moléculas diana no genéticas unidas simultáneamente con extracción de moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) de la misma muestra marcada. En estas realizaciones, tanto las moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) de interés como las secuencias de nucleótidos de identificación pueden detectarse simultáneamente en una mezcla de muestra única. En una realización, tanto las moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) de interés como las secuencias de nucleótidos de identificación pueden detectarse simultáneamente en una mezcla de muestra única usando el sistema de análisis nanoString nCounter®, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 8,415,102. En esta realización, una vez que las moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos) de las células y las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas están en solución, la mezcla de solución puede ponerse en contacto con conjuntos de sondas que comprenden sondas informadoras y sondas de captura como se describe en el presente documento para las secuencias de nucleótidos de identificación así como para las moléculas de ácidos nucleicos de la célula (materiales genéticos de las células) de interés. Una de las ventajas de usar la tecnología de hibridación nanoString nCounter® es que el análisis se puede realizar en lisados celulares, así como en muestras fijas, sin la necesidad de amplificación que pueda introducir sesgos, y con un tiempo mínimo de preparación práctica. Sin embargo, otros métodos reconocidos en la técnica para análisis de ácidos nucleicos o análisis genético como se describe en el presente documento (por ejemplo, pero sin limitarse a la secuenciación) también se pueden usar para la detección simultánea de ambas moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) de interés y nucleótido de identificación liberado secuencias de moléculas diana no genéticas unidas. Por ejemplo, en el caso de la secuenciación, tanto los materiales genéticos de las células (por ejemplo, ADN y/o ARNm) como las secuencias de nucleótidos de identificación correspondientes a las moléculas diana no genéticas pueden secuenciarse juntas.

En realizaciones alternativas, las moléculas de ácidos nucleicos se pueden extraer de una primera porción de una muestra, mientras que las moléculas diana no genéticas se pueden derivar u obtener independientemente de una segunda porción de la misma muestra. En estas realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos de interés y las moléculas diana no genéticas se pueden detectar por separado para determinar los niveles de expresión de las moléculas de ácidos nucleicos de interés y las moléculas diana no genéticas en la misma muestra. Las moléculas de ácidos nucleicos de interés pueden someterse a cualquier análisis de ácidos nucleicos reconocido en la técnica,

mientras que las moléculas diana no genéticas pueden detectarse mediante la detección e identificación de las secuencias de nucleótidos de identificación correspondientes liberadas de las sondas diana utilizando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento.

En algunas realizaciones, los métodos, sistemas y/o kits descritos en el presente documento pueden adaptarse para medir proteínas y moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) presentes en la misma muestra. Por ejemplo, las proteínas pueden marcarse mediante una o más realizaciones de las sondas diana descritas en el presente documento y detectarse utilizando los métodos, sistemas y/o kits descritos en el presente documento, mientras que las moléculas de ácidos nucleicos (materiales genéticos de las células) pueden detectarse por separado o simultáneamente por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, usando, en una realización, el kit de expresión génica nanoString nCounter®), por ejemplo, para un ensayo de múltiples analitos en la misma muestra. En una realización, la muestra puede comprender células cancerosas. El ensayo multianalito puede permitir la generación de un perfil de expresión integrado para la muestra, que puede proporcionar información sobre la interacción entre las proteínas y las moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, elementos reguladores genéticos como los microARN. Esto sería valioso o deseable en los casos en que estén disponibles muestras raras con un tamaño de muestra limitado. Por ejemplo, después de marcar una muestra o células o moléculas diana no genéticas (por ejemplo, proteínas) con las sondas diana que comprenden cada una secuencia de nucleótidos de identificación única (donde en una realización, las secuencias de nucleótidos de identificación son códigos de barras de ADN extraños o foráneos), las secuencias de nucleótidos de identificación (por ejemplo, códigos de barras de ADN extraños o foráneos) pueden liberarse de las células unidas o moléculas diana (por ejemplo, proteínas) simultáneamente con las moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y/o ADN) de la misma muestra o células, por ejemplo, utilizando regulador de lisis con o sin agentes de escisión adicionales (por ejemplo, pero sin limitarse a, agentes UV y/o químicos). Una vez que las moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y/o ADN) de las células y secuencias de nucleótidos de identificación únicas (por ejemplo, códigos de barras de ADN extraños) están en solución, se puede realizar un ensayo de hibridación. En una realización, el ensayo de hibridación puede ser un ensayo de análisis nanoString nCounter®. En el análisis de análisis nCounter®, los conjuntos de sondas pueden tener sondas informadoras y sondas de captura como se describe en este documento para las secuencias de nucleótidos de identificación (por ejemplo, códigos de barras de ADN extraños), así como para los genes de interés. Si el tamaño de la muestra no es una preocupación, una muestra puede dividirse en alícuotas o dividirse de manera que el análisis de proteínas y el análisis de expresión génica se puedan ejecutar por separado para obtener una lectura de ARNm y proteínas en la misma muestra (por ejemplo, una determinada población de células).

En algunas realizaciones, para optimizar la tecnología de hibridación nanoString nCounter® para la detección de secuencias de nucleótidos de identificación y/o materiales genéticos de las células, hay que, por ejemplo, asegurarse de que todas las sondas caigan en un rango lineal al contarlas en el volumen y la expresión de uno no saturan el sistema. Esto puede hacerse fácilmente con la optimización por parte de un experto en la materia, dependiendo del kit de interés.

En otra realización, al liberar secuencias de nucleótidos de identificación de moléculas diana unidas (por ejemplo, proteínas), el material genético y las secuencias de nucleótidos de identificación pueden extraerse simultáneamente de una muestra única, permitiendo análisis de interrelaciones proteína-ADN-ARN.

Aunque los métodos descritos en el presente documento se describen en el contexto en donde las secuencias de nucleótidos de identificación se liberan de las sondas diana unidas antes de la detección, en algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación no necesitan liberarse de las sondas diana unidas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento también pueden aplicarse cuando las secuencias de nucleótidos de identificación permanecen unidas a las sondas diana durante la detección.

En ciertas realizaciones, los métodos de detección se realizan en ensayos multiplex, por lo que se detectan una pluralidad de moléculas diana en el mismo ensayo (una única mezcla de reacción). En una realización, el ensayo es un ensayo de hibridación en donde la pluralidad de moléculas diana se detectan simultáneamente. En ciertas realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas en el mismo ensayo es, al menos 2 moléculas diana diferentes, al menos 5 moléculas diana diferentes, al menos 10 moléculas diana diferentes, al menos 20 moléculas diana diferentes, al menos 50 moléculas diana diferentes, al menos 75 moléculas diana diferentes, al menos 100 moléculas diana diferentes, al menos 200 moléculas diana diferentes, al menos 500 moléculas diana diferentes, o al menos 750 moléculas diana diferentes, o al menos 1000 moléculas diana diferentes. En otras realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas en el mismo ensayo es de hasta 50 moléculas diana diferentes, hasta 100 moléculas diana diferentes, hasta 150 moléculas diana diferentes, hasta 200 moléculas diana diferentes, hasta 300 moléculas diana diferentes, hasta 500 moléculas diana diferentes, hasta 750 moléculas diana diferentes, hasta 1000 moléculas diana diferentes, hasta 2000 moléculas diana diferentes o hasta 5000 moléculas diana diferentes. En otras realizaciones más, la pluralidad de moléculas diana detectadas es cualquier intervalo entre los números anteriores de diferentes moléculas diana, tales como, pero sin limitación, de 20 a 50 moléculas diana diferentes, de 50 a 200 moléculas diana diferentes, de 100 a 1000 moléculas diana diferentes, o de 500 a 5000 moléculas diana diferentes.

Sondas diana

Como se usa en este documento, el término "sonda diana" generalmente se refiere a una molécula sintética que se une específicamente a una molécula diana para su identificación y detección. De acuerdo con varios aspectos descritos en este documento, cada sonda diana comprende: (i) una molécula de unión a diana que se une específicamente a una molécula diana en una muestra; (ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y (iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible no comprende una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos monocatenarios) que es complementaria (para el emparejamiento de bases) a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de identificación. Es decir, en estas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de identificación no se libera de una molécula de unión a la diana mediante la separación de la secuencia de polinucleótidos complementaria acoplada a la molécula de unión a la diana. Por consiguiente, en algunas realizaciones, una sonda diana comprende (i) una molécula de unión a diana que se une específicamente a la molécula diana presente en la muestra; (ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y (iii) un enlazador escindible no hibridable entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación.

Moléculas de unión a dianas: Una molécula de unión a dianas es una molécula que se une específicamente a la molécula diana en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "unirse(s) específicamente" o "unión específica" se refiere a una molécula de unión a un objetivo que se une a una molécula diana con una mayor afinidad que cuando se une a otra molécula no objetivo en las mismas condiciones. La unión específica generalmente se indica mediante una constante de disociación de 1 μM o inferior, por ejemplo, 500 nM o inferior, 400 nM o inferior, 300 nM o inferior, 250 nM o inferior, 200 nM o inferior, 150 nM o inferior, 100 nM o inferior, 50 nM o inferior, 40 nM o inferior, 30 nM o inferior, 20 nM o inferior, 10 nM o inferior o 1 nM o inferior. Típicamente, la naturaleza de la interacción o unión es no covalente, por ejemplo, por hidrógeno, electrostática o interacciones de van der Waals, sin embargo, la unión también puede ser covalente. Las moléculas de unión a la diana pueden ser naturales, recombinantes o sintéticas. Ejemplos de la molécula de unión a la diana pueden incluir, entre otros, 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 carbohidrato, un aptámero y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión a la diana no incluye una molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a dianas pueden modificarse por cualquier medio conocido por un experto en la materia. Los métodos para modificar cada tipo de moléculas de unión a dianas son bien reconocidos en la técnica. Dependiendo de los tipos de moléculas de unión a dianas, una modificación de ejemplo incluye, pero no se limita a modificación genética, biotinylación, marcado (para fines de detección), modificación química (por ejemplo, para producir derivados o fragmentos de la molécula de unión a dianas), y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión a la diana puede modificarse genéticamente. En algunas realizaciones, la molécula de unión a la diana puede biotinilarse.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a la diana puede comprender un anticuerpo o una porción del mismo, o una molécula similar a un anticuerpo. Un anticuerpo o una porción del mismo o una molécula similar a un anticuerpo puede detectar el nivel de expresión de una proteína celular (incluyendo proteínas de la superficie celular, proteínas secretadas, proteínas citoplasmáticas y proteínas nucleares), o fosforilación u otro estado de modificación posterior a la traducción de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo o una porción del mismo o una molécula similar a un anticuerpo puede unirse específicamente a un marcador de proteína presente en una célula rara. Ejemplos de una célula rara incluyen, entre otros, una célula tumoral circulante, una célula fetal y/o una célula madre. En algunas realizaciones, el anticuerpo o una porción del mismo o una molécula similar a un anticuerpo puede unirse específicamente a un marcador o proteína diana asociada con una afección (por ejemplo, un estado saludable normal, o una enfermedad o trastorno). En algunas realizaciones, el anticuerpo o una porción del mismo o una molécula similar a un anticuerpo puede unirse específicamente a un marcador o proteína diana asociada con el cáncer. Por ejemplo, los marcadores o proteínas objetivo asociados con el cáncer pueden estar involucrados en apoptosis, epigenética, daño en el ADN, quinasas/oncogenes, marcadores de diagnóstico de cáncer, transición epitelial-mesenquimatoso, autofagia, proliferación y/o respuesta inmune.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a la diana puede comprender un ligando receptor de la superficie celular. Como se usa en este documento, un "ligando receptor de la superficie celular" se refiere a una molécula que puede unirse a la superficie externa de una célula. Un ejemplo de ligando de receptor de superficie celular incluye, por ejemplo, un péptido de unión a receptor de superficie celular, un glucopéptido de unión a receptor de superficie celular, una proteína de unión a receptor de superficie celular, una glucoproteína de unión a receptor de superficie celular, un compuesto orgánico de unión a receptor de superficie celular y una superficie celular fármaco de unión al receptor. Los ligandos adicionales del receptor de la superficie celular incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos y factores angiogénicos.

En algunas realizaciones, la molécula de unión a la diana comprende un anticuerpo seleccionado de la Tabla 1 en el Ejemplo, o un fragmento del mismo.

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a la diana de las sondas diana utilizadas en los métodos descritos en el presente documento pueden comprender al menos una parte o todos los anticuerpos enumerados en la Tabla 1 en el Ejemplo, o fragmentos de los mismos.

- 5 Secuencias de nucleótidos de identificación: Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de nucleótidos de identificación" se refiere a una secuencia de nucleótidos que identifica una molécula de unión a diana específica. Por lo tanto, cada secuencia de nucleótidos de identificación actúa como un código de identificación único para cada molécula de unión a la diana a la que se acopló.

- 10 En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación tienen estructuras secundarias mínimas o nulas, como cualquier interacción estable de apareamiento de bases intramoleculares (por ejemplo, horquillas). Sin desear limitarse a la teoría, en algunas realizaciones, la estructura secundaria mínima en las secuencias de nucleótidos de identificación puede proporcionar una mejor hibridación entre una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación y la sonda informadora, y/o entre una segunda porción de la identificación secuencia de nucleótidos y la sonda de captura. Además, la estructura secundaria mínima en la secuencia de nucleótidos de identificación puede proporcionar una mejor unión de la molécula de unión a la molécula diana correspondiente. En
15 algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación descritas aquí no tienen apareamiento intramolecular significativo a una temperatura de fusión predeterminada. La temperatura de fusión predeterminada puede variar de aproximadamente 65°C a 80°C o de aproximadamente 70°C a 80°C, o de aproximadamente 70°C a 75°C.

- 20 En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana descritas en el presente documento pueden seleccionarse o diseñarse de modo que no reaccionen de forma cruzada ni se unan a ninguna secuencia de ácidos nucleicos en un genoma de un sujeto cuya muestra se está evaluando. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana utilizadas para detectar moléculas diana en la muestra de un sujeto pueden seleccionarse o diseñarse con base en secuencias de nucleótidos de una especie o género que comparten una homología (identidad de secuencia) con la del sujeto por no más de 50% o menos, incluyendo, por
25 ejemplo, no más del 40%, no más del 30%, no más del 20%, no más del 10% o menos. En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden seleccionarse previamente para que no haya homología contra organismos principales (por ejemplo, pero sin limitarse a humanos y/u otros mamíferos) en la base de datos de la secuencia de referencia de NCBI (RefSeq). Solo a modo de ejemplo, en algunas realizaciones, las secuencias de identificación de nucleótidos de las sondas diana utilizadas en la muestra de un animal (por ejemplo, un mamífero tal como un humano) pueden derivarse de un genoma de planta. En una realización, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana utilizadas en una muestra humana pueden derivarse de un genoma de patata. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de identificación puede comprender una secuencia seleccionada de la Tabla 2 (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 110), o un fragmento de la misma.

- 35 En general, las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana pueden tener cualquier longitud de secuencia y pueden variar dependiendo de una serie de factores, que incluyen, entre otros, métodos de detección y/o el número de moléculas diana por detectar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la longitud de las secuencias de nucleótidos de identificación puede aumentar para proporcionar una identificación suficiente de un gran número de moléculas diana en una muestra. En algunas realizaciones en las que se usa un método basado en la hibridación para detectar secuencias de nucleótidos de identificación, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener una
40 longitud suficiente para proporcionar una unión confiable a sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura y generar señales detectables. En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener una longitud de aproximadamente 30-150 nucleótidos, o aproximadamente 30-100 nucleótidos, o aproximadamente 50-100 nucleótidos. En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener una longitud de al menos aproximadamente 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70,
45 al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden tener una longitud de aproximadamente 70 nucleótidos.

- En algunas realizaciones, las secuencias de identificación de nucleótidos descritas en el presente documento pueden tener una temperatura de fusión (T_m) bastante consistente. Sin desear limitarse a la teoría, la T_m de las secuencias de nucleótidos de identificación descritas en este documento se refiere a la temperatura a la cual el 50% del oligonucleótido y su complemento están en dúplex. La T_m consistente entre una población de secuencias de nucleótidos de identificación permite que los procedimientos de síntesis e hibridación se optimicen estrechamente, ya que las condiciones óptimas son sustancialmente las mismas para todos los puntos y posiciones. En algunas realizaciones, la T_m de una secuencia de nucleótidos de identificación cuando se hibrida con sus sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura se puede seleccionar para minimizar cualquier formación potencial de
55 estructuras secundarias (por ejemplo, horquillas) que podrían interferir con la hibridación de la sonda. En algunas realizaciones, la T_m de una secuencia de nucleótidos de identificación cuando se hibrida con sus sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura puede variar de aproximadamente 70-90°C, de aproximadamente 75-85°C, o de aproximadamente 79-82°C. En algunas realizaciones, la T_m de una secuencia de nucleótidos de identificación cuando se hibrida con sus sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura puede ser al menos 70°C, al menos 75°C, al menos 80°C, al menos 85°C o más. En algunas realizaciones, la T_m de una secuencia de nucleótidos de identificación cuando se hibrida con sus sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura puede ser de aproximadamente 80°C.

El contenido de GC de las secuencias de nucleótidos de identificación puede variar dependiendo de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, longitudes deseadas de sondas informadoras y/o sondas de captura descritas y/o temperaturas T_m deseadas. Por ejemplo, cuando las sondas informadoras y/o de captura son más cortas, el contenido de GC de las secuencias de nucleótidos de identificación puede aumentarse para mantener la T_m deseada consistente entre las sondas informadoras y/o de captura y las secuencias de nucleótidos de identificación para minimizar la formación potencial de estructuras secundarias (por ejemplo, horquillas) que podrían interferir con la hibridación de la sonda. En una realización, el contenido de GC de la secuencia de nucleótidos de identificación se optimiza para mantener la T_m de una secuencia de nucleótidos de identificación cuando se hibrida con sus sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura para que sean aproximadamente 80°C.

En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación tienen un contenido de GC equilibrado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, ningún nucleótido individual en la secuencia de nucleótidos de identificación puede durar más de 3 nt. Por ejemplo, ningún nucleótido G o nucleótido C corre más de 3 nt en la secuencia de nucleótidos de identificación. En una realización donde las sondas informadoras y/o de captura tienen una longitud de aproximadamente 35 nucleótidos, el contenido de GC se puede optimizar para mantener la T_m de las secuencias de nucleótidos de identificación correspondientes a aproximadamente 80°C; donde la secuencia de nucleótidos de identificación debe tener un contenido de GC equilibrado tanto como sea posible para evitar regiones locales de muy alta GC o operaciones de poli C/poli G.

En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación son secuencias de ADN.

Enlazadores escindibles: Como se usa en el presente documento, el término "enlazador escindible" se refiere a un enlazador que es suficientemente estable en un conjunto de condiciones, pero que se divide en un conjunto diferente de condiciones para liberar las dos partes que el enlazador mantiene unidos. En algunas realizaciones, el enlazador escindible se puede escindir al menos 1.5 veces o más (incluyendo, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces o más) más rápido bajo una primera condición de referencia (por ejemplo, con una división agente) que bajo una segunda condición de referencia (por ejemplo, sin un agente de escisión).

Por ejemplo, un enlazador escindible acopla una secuencia de nucleótidos de identificación y un agente de unión a dianas juntos bajo un conjunto de condiciones y puede escindirse, digerirse o degradarse bajo un conjunto diferente de condiciones para liberar la secuencia de nucleótidos de identificación. El enlazador escindible que acopla una molécula de unión a la diana a una secuencia de nucleótidos de identificación en una sonda diana puede controlar la liberación de la secuencia de nucleótidos de identificación de la sonda diana cuando sea necesario, por ejemplo, al unirse a una molécula diana, de modo que el nucleótido de identificación pueda liberarse para la detección. Los enlazadores escindibles son conocidos en la técnica, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, los que son sensibles a una enzima, pH, temperatura, luz, tensión de cizallamiento, sonicación, un agente químico (por ejemplo, ditiotretol) o cualquier combinación del mismo. En algunas realizaciones, el enlazador escindible puede ser sensible a la degradación de la luz y la proteína, por ejemplo, por una enzima.

Los enlazadores escindibles son susceptibles a agentes de escisión, por ejemplo, hidrólisis, pH, potencial redox y luz (por ejemplo, infrarrojo y/o UV) o la presencia de moléculas degradantes. Ejemplos de tales agentes degradantes incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad de sustrato, que incluyen, por ejemplo, enzimas oxidativas o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un enlazador redox escindible por reducción; esterasas; amidasas; endosomas o agentes que pueden crear un ambiente ácido, por ejemplo, aquellos que resultan en un pH de cinco o menos; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un enlazador ácido escindible actuando como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas del sustrato) y proteasas y fosfatasas. En algunas realizaciones, el enlazador escindible puede ser escindible por una enzima particular.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible es un enlazador escindible, no hibridable. Como se usa en este documento, el término "enlazador escindible, no hibridable" se refiere a un enlazador escindible como se definió anteriormente que no comprende una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos monocatenarios) complementaria (para emparejamiento de bases) a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de identificación descrita aquí. Es decir, en estas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de identificación no se libera de la molécula de unión a la diana separándose de la secuencia de polinucleótidos complementaria acoplada a la molécula de unión a la diana.

Enlazadores escindibles no hibridables de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, enlazadores hidrolizables, enlazadores escindibles redox (por ejemplo, -SS- y -C(R)₂-S-S-, en donde R es H o alquilo C₁-C₆ y al menos un R es alquilo C₁-C₆ tal como CH₃ o CH₂CH₃); enlazadores escindibles a base de fosfato (por ejemplo, -O-P(O)(OR)-O-, -O-P(S)(OR)-O-, -O-P(S)(SR)-O-, -S-P(O)(OR)-O-, -O-P(O)(OR)-S-, -S-P(O)(OR)-S-, -O-P(S)(OR)-S-, -S-P(S)(OR)-O-, -O-P(O)(R)-O-, -O-P(S)(R)-O-, -S-P(O)(R)-O-, -S-P(S)(R)-O-, -S-P(O)(R)-S-, -O-P(S)(R)-S-, -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, y -O-P(S)(H)-S-, en donde R es opcionalmente alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado sustituido); enlazadores escindibles con ácido (por ejemplo,

hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos, $-C=NN-$ y $-OC(O)-$; enlazadores escindibles a base de éster (por ejemplo, $-C(O)O-$); enlazadores escindibles basados en péptidos, (por ejemplo, enlazadores que se cortan mediante enzimas tales como peptidasas y proteasas en las células, por ejemplo, $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$, donde R^A y R^B son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes), enlazadores fotoescindibles y cualquier combinación de los mismos. Un enlazador escindible basado en péptidos 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. En algunas realizaciones, un enlazador escindible con ácido es escindible en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6.5 o inferior (por ejemplo, aproximadamente 6.5, 6.0, 5.5, 5.0 o inferior), o mediante agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general.

En algunas realizaciones, el enlazador no hibridable escindible puede comprender un enlace disulfuro, un grupo tetrazina-trans-cicloocteno, un grupo sulfhidrilo, un grupo nitrobenzilo, un grupo nitroindolina, un grupo bromo hidroxycumarina, un grupo bromo hidroxiquinolina, un grupo hidroxifenacilo, un grupo dimetocibenzoína, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible no hibridable puede comprender al menos uno de los enlazadores mostrados en la Figura 2A.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible no hibridable puede comprender un enlazador fotoescindible. Un enlazador fotoescindible es un enlazador que se puede cortar por exposición a radiación electromagnética (por ejemplo, luz visible, luz UV, infrarrojo, etc.). La longitud de onda de la luz necesaria para fotoescindir el enlazador depende de la estructura del enlazador fotoescindible utilizado. Se puede usar cualquier enlazador fotoescindible reconocido en la técnica para las sondas diana descritas en este documento. Ejemplos de enlazador fotoescindible incluyen, pero no se limitan a, moléculas químicas que contienen una unidad estructural o-nitrobenzilo, una unidad estructural p-nitrobenzilo, una unidad estructural m-nitrobenzilo, una unidad estructural nitroindolina, una unidad estructural bromo hidroxycumarina, una unidad estructural bromo hidroxiquinolina, una unidad estructural hidroxifenacilo, una unidad estructural dimetocibenzoína, o cualquier combinación de los mismos.

Grupos fotoescindibles de ejemplo adicionales se describen y revisan en general en Pelliccioli et al., Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications, Photochem. Photobiol. Sci. 1 441-458 (2002); Goeldner and Givens, Dynamic Studies in Biology, Wiley-VCH, Weinheim (2005); Marriott, Methods in Enzymology, vol. 291, Academic Press, San Diego (1998); Morrison, Bioorganic Photochemistry, vol. 2, Wiley, Nueva York (1993); Adams and Tsien, Annu. Rev. Physiol. 55 755-784 (1993); Mayer et al., Biologically Active Molecules with a "Light Switch", Angew. Chem Int. Ed. 45 4900-4921 (2006); Pettit et al., Neuron 19 465-471 (1997); Furuta et al., Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ilmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross- sections for two photon photolysis, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 96 1 193-1200 (1999); y Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,430,175; 5,635,608; 5,872,243; 5,888,829; 6,043,065; y Zebala, Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2010/0105120.

En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible puede describirse generalmente como un cromóforo. Ejemplos de cromóforos que son fotorresistentes a tales longitudes de onda incluyen, entre otros, acridinas, nitroaromáticos y arilsulfonamidas. La eficiencia y la longitud de onda a la que el cromóforo se fotoactiva y, por lo tanto, libera las secuencias de nucleótidos de identificación descritas en este documento, variará dependiendo del grupo o grupos funcionales particulares unidos al cromóforo. Por ejemplo, cuando se usan nitroaromáticos, como los derivados de compuestos o-nitrobenzilos, la longitud de onda de absorción puede alargarse significativamente mediante la adición de grupos metoxi.

En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible puede comprender un compuesto nitroaromático. Los enlazadores fotoescindibles de ejemplo que tienen un armazón de núcleo orto-nitroaromático incluyen, pero no se limitan a, orto-nitrobenzilo ("ONB"), 1-(2-nitrofenil)etil ("NPE"), alfa-carboxi-2-nitrobenzilo ("CNB"), 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzilo ("DMNB"), 1-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)etil ("DMNPE"), 5-carboximetoxi-2-nitrobenzilo ("CMNB") y ((5-carboximetoxi-2-nitrobenzilo)oxi)carbonil ("CMNCBZ") núcleos fotolábiles. Se apreciará que los sustituyentes en el núcleo aromático se seleccionan para adaptar la longitud de onda de absorción, con grupos donadores de electrones (por ejemplo, metoxi) que generalmente conducen a una absorción de longitud de onda más larga. Por ejemplo, el nitrobenzilo ("NB") y el nitrofeniletilo ("NPE") se modifican mediante la adición de dos residuos metoxi en 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzilo y 1-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)etil, respectivamente, aumentando así el rango de longitud de onda de absorción a 340-360 nm.

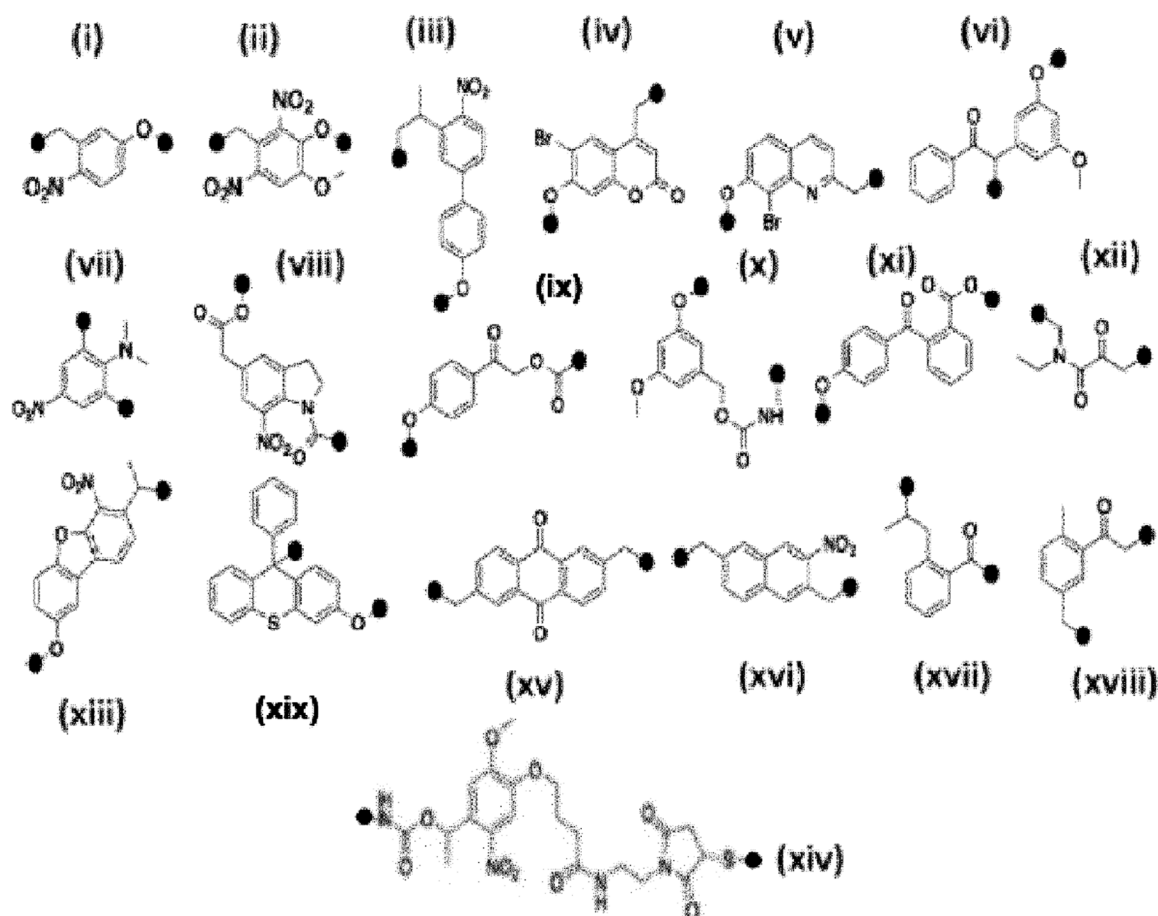
Además, otros andamios de núcleo orto-nitroaromáticos incluyen aquellos que atrapan subproductos nitrosos en una reacción hetero Diels Alder como se discute en general en Zebala, Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2010/0105120 y Pirrung et al., J. Org. Chem 68: 1 138 (2003). El cromóforo nitrodibenzofurano ("NDBF") ofrece un coeficiente de extinción significativamente mayor en la región UV cercana, pero también tiene un rendimiento cuántico muy alto para la reacción de desprotección y es adecuado para la activación de dos fotones (Momotake et al., The nitrodibenzofuran chromophore: a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells, Nat. Methods 3 35-40 (2006)). El grupo NPP es una alternativa introducida por Pfeleiderer et al. que produce una especie de nitroestiril menos dañina (Walbert et al., Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Mechanistic Studies of the 2-(2-Nitrofenil)etil Group, Helv. Chim. Acta 84 1601-1611 (2001)).

En realizaciones de ejemplo que implican luz UV, los enlazadores fotoescindibles pueden seleccionarse del grupo que consiste en alfa-carboxi-2-nitrobencilo (CNB, 260 nm), 1-(2-nitrofenil)etil (NPE, 260 nm), 4,5-dimetoxi-2-nitrobencilo (DMNB, 355 nm), 1-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)etil (DMNPE, 355 nm), (4,5-dimetoxi-2-nitrobenzoxi)carbonilo (NVOC, 355 nm), 5-carboximetoxi-2-nitrobencilo (CMNB, 320 nm), ((5-carboximetoxi-2-nitrobenzil)oxi)carbonilo (CMNCBZ, 320 nm), desoxibenzoinilo (desilo, 360 nm) y antraquino-2-ilmetoxicarbonilo (AQMOC, 350 nm).

Otros enlazadores fotoescindibles adecuados se basan en el sistema de cumarina, tales como BHC (Furuta e Iwamura, *Methods Enzymol.* 291 50-63 (1998); Furuta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 1 193-200 (1999); Suzuki et al., *Org. Lett.* 5: 4867 (2003); Patente de los Estados Unidos No. 6,472,541). Las fotocélulas de enlace DMACM en nanosegundos (Hagen et al., [7-(Dialkylamino)coumarin-4-yl]methyl- Caged Compounds as Ultrafast and Effective Long-Wavelength Phototriggers of 8-Bromo- Substituted Cyclic Nucleotides, *Chem Bio Chem* 4 434 -442 (2003)) y se escinde con luz visible (Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. de serie 11/402,715). Los enlaces fotolábiles a base de cumarina también están disponibles para unirse a aldehídos y cetonas (Lu et al., Bhc-diol as a photolabile protecting group for aldehydes and ketones, *Org. Lett.* 5 2119-2122 (2003)). Los análogos estrechamente relacionados, como BHQ, también son adecuados (Fedoryak et al., Brominated hydroxyquinoline as a photolabile protecting group with sensitivity to multiphoton excitation, *Org. Lett.* 4 3419-3422 (2002)). Otro enlazador fotoescindible adecuado comprende el grupo pHP (Park and Givens, *J. Am. Chem. Soc.* 119: 2453 (1997), Givens et al., *New Phototriggers 9: New Phototriggers 9: p -Hydroxyphenacyl as a C-Terminal Photoremovable Protecting Group for Oligopeptides*, *J. Am. Chem. Soc.* 122 2687-2697 (2000); Zhang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 121 5625-5632, (1999); Conrad et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122 9346-9347 (2000); Conrad et al., *Org. Lett.* 2 1545-1547 (2000)). También es adecuado un enlace fotolábil derivado de ketoprofeno (Lukeman et al., Photocages mediado por Carbanion: fotorelease rápido y eficiente con compatibilidad acuosa, *J. Am. Chem. Soc.* 127 7698-7699 (2005)).

En algunas realizaciones, un enlazador fotoescindible es aquel cuya unión covalente a una secuencia de nucleótidos de identificación y/o agente de unión a la diana se invierte (escinde) por exposición a la luz de una longitud de onda apropiada. En algunas realizaciones, la liberación de las secuencias de nucleótidos de identificación ocurre cuando el conjugado se somete a luz ultravioleta. Por ejemplo, la fotoliberación de las secuencias de nucleótidos de identificación puede ocurrir en una longitud de onda que varía de aproximadamente 200 a 380 nm (la longitud de onda exacta o el rango de longitud de onda dependerá del enlazador fotoescindible específico utilizado, y puede ser, por ejemplo, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370 o 380 o algún rango entre ellos). En algunas realizaciones, la liberación de las secuencias de nucleótidos de identificación ocurre cuando el conjugado se somete a luz visible. Por ejemplo, la fotoliberación de las secuencias de nucleótidos de identificación puede ocurrir a una longitud de onda que varía de aproximadamente 380 a 780 nm (la longitud de onda exacta o el rango de longitud de onda dependerá del enlazador fotoescindible específico utilizado, y podría ser, por ejemplo, 380, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 o 780, o algún rango entre ellos). En algunas realizaciones, la liberación de las secuencias de nucleótidos de identificación ocurre cuando el conjugado se somete a luz infrarroja. Por ejemplo, la fotoliberación de las secuencias de nucleótidos de identificación puede ocurrir en una longitud de onda que varía de aproximadamente 780 a 1200 nm (la longitud de onda exacta o el rango de longitud de onda dependerá del enlazador fotoescindible específico utilizado, y podría ser, por ejemplo, 780, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 o 1200, o algún rango entre ellos).

En algunas realizaciones, se puede seleccionar un enlazador fotoescindible del grupo que consiste en moléculas (i)-(xix) y cualquier combinación de las mismas, en donde las estructuras químicas de las moléculas (i)-(xix) se muestran como sigue:



donde cada uno de los puntos negros en cada molécula representa un punto de conexión o acoplamiento que se conecta, directa o indirectamente, a una molécula de unión a la diana descrita en el presente documento o una secuencia de nucleótidos de identificación descrita en el presente documento. El punto de conexión puede ser un enlace, o comprender un átomo, una molécula y/o un enlazador descrito aquí. En algunas realizaciones, el punto de conexión es un enlace.

En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible puede comprender la molécula (xiv).

En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible es un enlazador bifuncional fotoescindible. En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible es un enlazador multifuncional fotoescindible.

En algunas realizaciones donde se usa un enlazador fotoescindible, las secuencias de nucleótidos de identificación pueden liberarse de las sondas diana unidas exponiendo las sondas diana unidas a una luz de una longitud de onda especificada. En algunas realizaciones, se puede usar luz ultravioleta (UV) o luz ultravioleta cercana para liberar secuencias de nucleótidos de identificación de sondas diana unidas. En algunas realizaciones, la liberación de las secuencias de nucleótidos de identificación puede ocurrir a una longitud de onda que varía de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 450 nm.

Los agentes de activación se pueden usar para activar los componentes que se conjugarán juntos (por ejemplo, secuencias de nucleótidos de identificación y/o moléculas de unión a diana). Sin limitaciones, se puede usar cualquier proceso y/o reactivo conocido en la técnica para la activación de conjugación. Ejemplos de métodos de activación de superficie o reactivos incluyen, entre otros, hidrócloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC o EDAC), hidroxibenzotriazol (HOBT), N-hidroxisuccinimida (NHS), 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio hexafluorofosfato metanaminio (HATU), silanización, sulfosuccinimidil 6-[3'(2-[piridiliditio]-propionamido]hexanoato (sulfo-LC-SPDP), 2-iminotiolano (agente de Traut), éster N-hidroxi-succinimidílico de transcicloocteno (TCO-NHS), activación de superficie mediante tratamiento con plasma y similares.

De nuevo, sin limitaciones, cualquier grupo reactivo conocido en la técnica puede usarse para acoplar un enlazador fotoescindible entre una secuencia de nucleótidos de identificación y una molécula de unión a diana. Por ejemplo, se pueden usar varios grupos reactivos de superficie para el acoplamiento de superficie, que incluyen, pero no se limitan a, haluro de alquilo, aldehído, amino, bromo o yodoacetilo, carboxilo, hidroxilo, epoxi, éster, silano, tiol y similares.

Sondas de control

Como se usa en este documento, el término "sonda de control" generalmente se refiere a una molécula sintética que se une específicamente a una molécula de control para identificación y detección. De acuerdo con diversos aspectos descritos en este documento, cada sonda de control comprende: (i) una molécula de unión de control que se une específicamente a una molécula de control en una muestra; (ii) una secuencia de control de identificación que identifica la molécula de unión de control; y (iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión de control y la secuencia de control de identificación.

Moléculas de unión de control: Una molécula de unión de control es una molécula que se une específicamente a una molécula de control en una muestra. Ejemplos de una proteína de control incluyen, pero no se limitan a, proteínas de mantenimiento (por ejemplo, GAPDH, actina y/o tubulina), isotipos de control de IgG, proteínas mutantes no funcionales o no vinculantes (por ejemplo, anticuerpos no funcionales o no vinculantes, o proteínas mutadas tales como una proteína G que ha sido mutada en el sitio de unión), y cualquier combinación de las mismas. Típicamente, la naturaleza de la interacción o unión es no covalente, por ejemplo, por hidrógeno, electrostática o interacciones de van der Waals, sin embargo, la unión también puede ser covalente. Las moléculas de control de unión pueden ser naturales, recombinantes o sintéticas. Ejemplos de la molécula de unión de control pueden incluir, entre otros, 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 carbohidrato, un aptámero y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión de control no incluye una molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, las moléculas de unión de control pueden modificarse por cualquier medio conocido por un experto en la técnica. Los métodos para modificar cada tipo de moléculas de unión de control son bien reconocidos en la técnica. Dependiendo de los tipos de moléculas de unión de control, una modificación de ejemplo incluye, pero no se limita a modificación genética, biotinylation, marcación (para fines de detección), modificación química (por ejemplo, para producir derivados o fragmentos de la molécula de unión de control), y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión de control puede modificarse genéticamente. En algunas realizaciones, la molécula de unión de control puede biotinarse.

En algunas realizaciones, la molécula de unión de control puede comprender un anticuerpo o una porción del mismo, o una molécula similar a un anticuerpo. Un anticuerpo o una porción del mismo o una molécula similar a un anticuerpo puede detectar el nivel de expresión de una proteína doméstica, por ejemplo, pero sin limitarse a GAPDH, actina y/o tubulina. En algunas realizaciones, el anticuerpo o una porción del mismo o una molécula similar a un anticuerpo puede unirse específicamente a un isotipo IgG de control. En algunas realizaciones, el anticuerpo o una porción del mismo o una molécula similar a un anticuerpo puede unirse específicamente a una proteína mutante sin función o sin unión, por ejemplo, una proteína G que ha sido mutada en el sitio de unión.

Secuencias de control de identificación: Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de control de identificación" se refiere a una secuencia de nucleótidos que identifica una molécula de unión de control específica. Por lo tanto, cada secuencia de control de identificación actúa como un código de identificación único para cada molécula de unión de control a la que estaba acoplada.

En algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación tienen estructuras secundarias mínimas o nulas, tales como cualquier interacción estable de apareamiento de bases intramoleculares (por ejemplo, horquillas). Sin desear estar limitados por la teoría, en algunas realizaciones, la estructura secundaria mínima en las secuencias de control de identificación puede proporcionar una mejor hibridación entre una primera porción de la secuencia de control de identificación y la sonda informadora, y/o entre una segunda porción de la identificación secuencia de control y la sonda de captura. Además, la estructura secundaria mínima en la secuencia de control de identificación puede proporcionar una mejor unión de la molécula de unión de control a la molécula de control correspondiente. En algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación descritas en este documento no tienen apareamiento intramolecular significativo a una temperatura de fusión predeterminada. La temperatura de fusión predeterminada puede variar de aproximadamente 65°C a 80°C o de aproximadamente 70°C a 80°C, o de aproximadamente 70°C a 75°C.

En algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación de las sondas de control descritas en el presente documento pueden seleccionarse o diseñarse de modo que no reaccionen de forma cruzada ni se unan a ninguna secuencia de ácidos nucleicos en un genoma de un sujeto cuya muestra se está evaluando. Por lo tanto, las secuencias de control de identificación de las sondas de control utilizadas para detectar moléculas de control en la muestra de un sujeto pueden seleccionarse o diseñarse con base en secuencias de nucleótidos de una especie o género que comparten una homología (identidad de secuencia) con la del sujeto por no más de 50% o menos, incluyendo, por ejemplo, no más del 40%, no más del 30%, no más del 20%, no más del 10% o menos. Solo a modo de ejemplo, en algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación de las sondas de control utilizadas en la muestra de un animal (por ejemplo, un mamífero como un humano) pueden derivarse de un genoma de planta. En una realización, las secuencias de control de identificación de las sondas de control usadas en una muestra humana pueden derivarse de un genoma de patata. En algunas realizaciones, la secuencia de control de identificación puede

comprender una secuencia seleccionada de la Tabla 2 (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 110), o un fragmento de la misma.

En general, las secuencias de control de identificación de las sondas de control pueden tener cualquier longitud de secuencia y pueden variar dependiendo de una serie de factores, que incluyen, pero no se limitan a, métodos de detección, y/o la cantidad de moléculas de control a detectar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la longitud de las secuencias de control de identificación puede aumentar para proporcionar una identificación suficiente de un gran número de moléculas de control en una muestra. En algunas realizaciones en las que se usa un método basado en hibridación para detectar secuencias de control de identificación, las secuencias de control de identificación pueden tener una longitud suficiente para proporcionar una unión fiable a sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura y generar señales detectables. En algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación pueden tener una longitud de aproximadamente 30-150 nucleótidos, o aproximadamente 30-100 nucleótidos, o aproximadamente 50-100 nucleótidos. En algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación pueden tener una longitud de al menos aproximadamente 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación pueden tener una longitud de aproximadamente 70 nucleótidos.

En algunas realizaciones, las secuencias de control de identificación descritas en el presente documento pueden tener una temperatura de fusión (T_m) bastante consistente. Sin desear limitarse a la teoría, la T_m de las secuencias de control de identificación descritas en este documento se refiere a la temperatura a la cual el 50% del oligonucleótido y su complemento están en dúplex. La T_m constante entre una población de secuencias de control de identificación permite que los procedimientos de síntesis e hibridación se optimicen estrictamente, ya que las condiciones óptimas son sustancialmente las mismas para todos los puntos y posiciones. En algunas realizaciones, la T_m de una secuencia de control de identificación cuando se hibrida con sus sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura puede variar de aproximadamente 70-90°C, de aproximadamente 75-85°C, o de aproximadamente 79-82°C. En algunas realizaciones, la T_m de una secuencia de control de identificación cuando se hibrida con sus sondas informadoras complementarias y/o sondas de captura puede ser al menos 70°C, al menos 75°C, al menos 80°C, al menos 85°C o más.

Enlazadores escindibles: Cualquier enlazador escindible usado en las sondas diana puede usarse en las sondas de control. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende un enlazador fotoescindible. En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible se puede seleccionar del grupo que consiste en las moléculas (i)-(xix) mostradas aquí y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible puede comprender la molécula (xiv).

Sondas informadoras

Como se usa en el presente documento, el término "sonda informadora" generalmente se refiere a una molécula sintética que se une a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación de una sonda diana y genera una señal detectable que es distinguible para la sonda informadora y la secuencia de nucleótidos de identificación unida.

En algunas realizaciones, las sondas informadoras tienen estructuras secundarias mínimas o nulas, como cualquier interacción estable de apareamiento de bases intramoleculares (por ejemplo, horquillas). Sin desear limitarse a la teoría, la estructura secundaria mínima en las sondas informadoras puede proporcionar una mejor hibridación entre la columna vertebral de la sonda informadora y una porción de las secuencias de nucleótidos de identificación. Además, la estructura secundaria mínima en las sondas informadoras puede proporcionar una mejor detección de la etiqueta detectable en las sondas informadoras. En algunas realizaciones, las sondas informadoras descritas en el presente documento no tienen apareamiento intramolecular significativo a una temperatura de fusión predeterminada. La temperatura de fusión predeterminada puede variar de aproximadamente 65°C-80°C o de aproximadamente 70°C-80°C, o de aproximadamente 70°C-75°C. Las estructuras secundarias se pueden predecir mediante programas conocidos en la técnica como MFOLD.

Una sonda informadora comprende generalmente una etiqueta detectable que identifica la sonda informadora. Como se usa en el presente documento, el término "marcador detectable" se refiere a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia de un objetivo, por ejemplo, una sonda informadora unida a una secuencia de nucleótidos de identificación de una sonda diana. Las etiquetas detectables incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores detectables adecuados pueden incluir moléculas fluorescentes, radioisótopos, cromóforos de nucleótidos, enzimas, sustratos, unidades estructurales quimioluminiscentes, unidades estructurales bioluminiscentes y similares. Como tal, un marcador detectable es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos necesarios para los métodos y dispositivos descritos en este documento.

En algunas realizaciones, el marcador detectable de las sondas informadoras puede comprender una o más moléculas marcadoras que crean una señal única para cada sonda informadora. En algunas realizaciones, el marcador detectable de las sondas informadoras puede comprender una molécula marcadora. En algunas realizaciones, el

marcador detectable de las sondas informadoras puede comprender al menos dos o más (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 o más) moléculas marcadoras. Como se usa en el presente documento, el término "molécula marcadora" es una molécula que es capaz de producir una señal detectable, que constituye al menos parte de la señal detectable producida por la etiqueta detectable. En consecuencia, una molécula marcadora puede ser una molécula fluorescente, un radioisótopo, un cromóforo nucleótido, una enzima, un sustrato, una unidad estructural quimioluminiscente, una unidad estructural bioluminiscente, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el marcador detectable y/o la(s) molécula(s) marcadora(s) pueden generar una señal óptica. La señal óptica puede ser una señal emisora de luz o una serie o secuencia de señales emisoras de luz. En algunas realizaciones, las moléculas marcadoras para la generación de una señal óptica pueden comprender uno o una pluralidad de (por ejemplo, al menos 2 o más, que incluyen, por ejemplo, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o más) una unidad estructural fluorocromo, una unidad estructural fluorescente, una unidad estructural colorante, una unidad estructural quimioluminiscente, o cualquier combinación de los mismos.

En la técnica se conoce una amplia variedad de tintes fluorescentes informadores. Típicamente, el fluoróforo es un compuesto aromático o heteroaromático y puede ser un pireno, antraceno, naftaleno, acridina, estilbeno, indol, benzindol, oxazol, tiazol, benzotiazol, cianina, carbocianina, salicilato, antranilato, cumarina, fluoresceína rodamina u otro compuesto similar.

Fluoróforos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 1,5 IAEDANS; 1,8-ANS; 4-metillumbeliferona; 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-carboxinaptofluoresceína (pH 10); 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA); 5-FAM (5-carboxifluoresceína); 5-hidroxitriptamina (HAT); 5-ROX (carboxi-X-rodamina); 5-TAMRA (5-carboxitetrametilrodamina); 6-carboxi-rodamina 6G; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-amino-4-metilcumarina; 7-aminoactinomicina D (7-AAD); 7-hidroxi-4-metilcumarina; 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina; ABQ; Fucsina ácido; ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina); Naranja de acridina; Rojo de acridina; Amarillo de acridina; Acriflavina; Acriflavina Feulgen SITSA; Aequorin (fotoproteína); Alexa Fluor 350™; Alexa Fluor 430™; Alexa Fluor 488™; Alexa Fluor 532™; Alexa Fluor 546™; Alexa Fluor 568™; Alexa Fluor 594™; Alexa Fluor 633™; Alexa Fluor 647™; Alexa Fluor 660™; Alexa Fluor 680™; Alizarina complexon; Rojo de alizarina; Aloficocianina (APC); AMC, AMCA-S; AMCA (aminometilcumarina); AMCA-X; Aminoactinomicina D; Aminocoumarina; Azul anilina; Antrociol estearato; APC-Cy7; APTS; Rojo Astrazon Brillante 4G; Naranja Astrazon R; Rojo Astrazon 6B; Amarillo Astrazon 7 GLL; Atabrina; ATTO-TAG™ CBQCA; ATTO-TAG™ FQ; Auramina; Aurofosfina G; Aurofosfina; BAO 9 (bisaminofeniloxadiazol); BCECF (pH alto); BCECF (pH bajo); Sulfato de berberina; Beta lactamasa; BFP azul GFP desplazado (Y66H); BG-647; Bimano; Bisbenzamida; Blancophor FFG; Blancophor SV; BOBO™ -1; BOBO™ -3; Bodipy 492/515; Bodipy 493/503; Bodipy 500/510; Bodipy 505/515; Bodipy 530/550; Bodipy 542/563; Bodipy 558/568; Bodipy 564/570; Bodipy 576/589; Bodipy 581/591; Bodipy 630/650-X; Bodipy 650/665-X; Bodipy 665/676; Bodipy FI; Bodipy FL ATP; Bodipy FI-Ceramida; Bodipy R6G SE; Bodipy TMR; Conjugado Bodipy TMR-X; Bodipy TMR-X, SE; Bodipy TR; Bodipy TR ATP; Bodipy TR-X SE; BO-PRO™ -1; BO-PRO™ -3; Brillante sulfoflavina FF; Calceína; Calceína Azul; Calcio Crimson™; Verde de calcio; Calcio Verde-1 Ca2+ Tinte; Calcio Verde-2 Ca2+; Calcio Verde-5N Ca2+; Calcio Verde-C18 Ca2+; Naranja de calcio; Calcofluor Blanco; Carboxi-X-rodamina (5-ROX); Cascade Blue™; Amarillo en cascada; Catecolamina; CFDA; CFP -proteína cian fluorescente; Clorofila; Cromomicina A; Cromomicina A; CMFDA; Coelenterazina; Coelenterazina cp; Coelenterazina f; Coelenterazina fcp; Coelenterazina h; Coelenterazina hcp; Coelenterazina ip; Coelenterazina O; Cumarina faloidina; CPM metilcumarina; CTC; Cy2™; Cy3.1 8; Cy3.5™; Cy3™; Cy5.1 8; Cy5.5™; Cy5™; Cy7™; Cian GFP; Fluorosensor AMP cíclico (FiCRhR); d2; Dabcyl; Dansil; Dansilamina; Dansil Cadaverina; Cloruro de dansilo; Dansil DHPE; Fluoruro de dansilo; DAPI Dapoxilo; Dapoxilo 2; Dapoxilo 3; DCFDA; DCFH (diacetato de diclorodihidrofluoresceína); DDAO; DHR (dihidrododamina 123); Di-4-ANEPPS; Di-8-ANEPPS (sin relación); DiA (4-Di-16-ASP); DIDS; Dihidrododamina 123 (DHR); DiO (DiOC18(3)); DiR; DiR (DiIC18(7)); Dopamina; DsRed; DTAF; DY-630-NHS; DY-635-NHS; EBFP; ECFP; EGFP; ELF 97; Eosina; Eritrosina; Eritrosina ITC; homodímero-1 de etidio (EthD-1); Euchrysin; Cloruro de europio (III); Europio; EYFP; Azul rápido; FDA; Feulgen (pararosanilina); FITC; FL-645; Flazo naranja; Fluo-3; Fluo-4; Diacetato de fluoresceína; Fluoro-esmeralda; Fluoro-oro (hidroxiestilbamidina); Fluor-Ruby; FluorX; FM 1-43™; FM 4-46; Fura Red™ (pH alto); Fura-2, alto en calcio; Fura-2, bajo en calcio; Genacryl Rojo Brillante B; Genacryl Amarillo Brillante 10GF; Roda Genacryl 3G; Amarillo Genacryl 5GF; GFP (S65T); GFP rojo desplazado (rsGFP); GFP tipo salvaje, excitación no UV (wtGFP); GFP tipo salvaje, excitación UV (wtGFP); GFPuv; Ácido gloxálico; Azul granular; Hematoporfirina; Hoechst 33258; Hoechst 33342; Hoechst 34580; HPTS; Hidroxycumarina; Hidroxiestilbamidina (FluoroGold); Hidroxitriptamina; Indodicarbocianina (DiD); Indotricarbocianina (DiR); Intrawhite Cf; JC-1; JO-JO-1; JO-PRO-1; LaserPro; Laurodan; SUD 751; Leucophor PAF; Leucophor SF; Leucophor WS; Lisamina rodamina; Lisamina Rodamina B; LOLO-1; LO-PRO-1; Amarillo Lucifer; Verde Mag; Rojo Magdala (floxina B); Verde de magnesio; Naranja de magnesio; Verde malaquita; Azul Marina; Maxilon Flavina brillante 10 GFF; Maxilon Brilliant Flavin 8 GFF; Merocianina; Metoxicumarina; Mitotracker Green FM; Mitotracker Orange; Mitotracker Red; Mitramicina; Monobromobimano; Monobromobimano (mBBR-GSH); Monoclorobimano; MPS (metil verde pironin estilbeno); NBD; NBD Amina; Rojo del Nilo; Nitrobenzoxadidole; Noradrenalina; Rojo Rápido Nuclear; Amarillo nuclear; Nylosan Brilliant lavin E8G; Oregon Green™; Oregon Green 488-X; Oregon Green™ 488; Oregon Green™ 500; Oregon Green™ 514; Pacifico Azul; Pararosanilina (Feulgen); PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; PE-TexasRed (Rojo 613); Phloxin B (Magdala Red); Phorwite AR; Phorwite BKL; Phorwite Rev; Phorwite RPA; Fosfina 3R; PhotoResist; Ficoeritrina B [PE]; Ficoeritrina R [PE]; PKH26; PKH67; PMIA; Pontocromo Azul Negro; POPO-1; POPO-3; PO-PRO-1; PO-PRO-3; Primulina; Amarillo Procion; Yoduro de propidio (PI); PyMPO; Pireno; Pironina; Pironina B; Pirozal brillante Flavin 7GF; QSY 7; Mostaza quinacrina; Resorufin; RH 414; Rhod-2; Rodamina; Rodamina

110; Rodamina 123; Rodamina 5 GLD; Rodamina 6G; Rodamina B 540; Rodamina B 200; Rodamina B extra; Rodamina BB; Rodamina BG; Verde de rodamina; Rodamina Phallicidine; Rodamina Faloidina; Rojo de rodamina; Rodamina WT; Rosa de bengala; R-ficoeritrina (PE); GFP desplazado al rojo (rsGFP, S65T); S65A; S65C; S65L; S65T; Zafiro GFP; Serotonina; Rojo Brillante Sevron 2B; Rojo Sevron 4G; Rojo Brillante Sevron B; Naranja sevron; Amarillo Sevron L; sgBFPTM; sgBFPTM (super bright BFP); sgGFPTM; sgGFPTM (súper brillo GFP); SITS; SITS (Primulina); SITS (ácido isotiosulfónico de estilbeno); SPQ (6-metoxi-N-(3-sulfopropil)-quinolinio); Estilbeno; Sulforrodamina B o C; Sulforrodamina G Extra; Tetraciclina; Tetrametilrodamina; Texas RedTM; Conjugado Texas Red-XTM; Tiadibarcocianina (DiSC3); Tiazina roja R; Naranja tiazol; Tioflavina 5; Tioflavina S; Tioflavina TCN; Tiolito; Tiozol naranja; Tinopol CBS (Blanco Calcofluor); TMR; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; TriColor (PE-Cy5); TRITC (tetrametilrodamina isotiocianato); TruRed; Ultralite; Uranina B; Uvitex SFC; wt GFP; WW 781; XL665; X-rodamina; XRITC; Naranja de xileno; Y66F; Y66H; Y66W; GFP amarillo; YFP; YO-PRO-1; YO-PRO-3; YOYO-1; y YOYO-3. Muchas formas adecuadas de estos compuestos fluorescentes están disponibles y pueden usarse.

Otros ejemplos de marcadores detectables y/o moléculas de marcado incluyen marcadores luminiscentes y bioluminiscentes (por ejemplo, biotina, luciferasa (por ejemplo, bacteriana, luciérnaga, escarabajo clic y similares), luciferina y aequorina), radiomarcadores (por ejemplo, 3H, 125I, 35S, 14C o 32P), enzimas (por ejemplo, galactosidasas, glucorinidasas, fosfatasas (por ejemplo, fosfatasa alcalina), peroxidasas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante) y colinesterasas) y etiquetas calorimétricas como oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, perlas de poliestireno, polipropileno y látex). Las patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen las Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 y 4,366,241.

Los expertos en la técnica conocen bien los medios para detectar tales marcadores y/o moléculas de marcado detectables. Así, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse utilizando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse utilizando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato enzimático y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato enzimático, y las etiquetas calorimétricas se pueden detectar visualizando la etiqueta coloreada.

En algunas realizaciones, las moléculas de marcación y/o marcación detectable pueden comprender al menos una o más (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos o siete o más) fluoróforos o puntos cuánticos. Sin desear estar sujeto a una teoría, el uso de un reactivo fluorescente puede reducir la señal a ruido en la imagen/lectura, manteniendo así la sensibilidad. La secuencia de color de las moléculas marcadoras en la etiqueta detectable puede proporcionar una identidad a la sonda informadora correspondiente. Por ejemplo, una sonda informadora I comprende una etiqueta detectable con tres fluoróforos en el siguiente orden: fluoróforo A; fluoróforo B y fluoróforo C; mientras que una sonda informadora II comprende un marcador detectable con los mismos tres fluoróforos, pero en un orden diferente: fluoróforo A; fluoróforo C y fluoróforo B. Mientras que las sondas informadoras I y II tienen los mismos fluoróforos, las secuencias de color de la sonda informadora I y la sonda informadora II son distintas, lo que identifica las sondas informadoras individuales.

En algunas realizaciones, la molécula marcadora puede comprender una enzima que produce un cambio en el color de un sustrato enzimático. Se puede usar una variedad de enzimas como la peroxidasa de rábano picante (HRP) y el peróxido alcalino (AP), con sustratos colorimétricos o fluorogénicos. En algunas realizaciones, la enzima informadora produce un cambio calorimétrico que puede medirse como absorción de luz a una longitud de onda particular. Las enzimas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, beta-galactosidasas, peroxidasas, catalasas, fosfatasas alcalinas y similares.

En algunas realizaciones, la sonda informadora puede comprender además una primera región específica de la sonda diana que se une a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación de una sonda diana. En consecuencia, en algunas realizaciones, una sonda informadora puede comprender: (a) una primera región específica de la sonda diana que se une a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y (b) una etiqueta detectable que identifica la sonda informadora.

Como se usa en el presente documento, el término "primera región específica de la sonda diana" se refiere a una región de una sonda informadora que se une a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación de una sonda diana. La primera región específica de la sonda diana puede comprender un patrón espaciado con bastante regularidad de un residuo de nucleótido y/o un grupo (por ejemplo, al menos 2 o más) de residuos de nucleótidos en la cadena principal. En algunas realizaciones, un residuo de nucleótido y/o un grupo (por ejemplo, al menos 2 o más) de residuos de nucleótido pueden estar separados al menos un promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 bases separadas dentro de la primera región específica de la sonda diana. Esto permite una primera región específica de sonda diana que tiene un patrón regularmente espaciado de un nucleótido o un grupo de nucleótidos que se une a una secuencia de nucleótidos que tiene un nucleótido complementario o un grupo de nucleótidos complementarios regularmente separados por aproximadamente el mismo número de bases. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando la primera región específica de la sonda diana contiene un patrón de residuos de adenina bastante espaciado regularmente en la columna vertebral, puede unirse a una secuencia de nucleótidos que tiene un residuo de timina bastante regularmente espaciado por aproximadamente el mismo número de bases.

En algunas realizaciones, al menos 30% o más (incluyendo, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 99% o 100%) de la primera región específica de la sonda diana es complementaria a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación. Como se usa en este documento y en toda la memoria descriptiva, el término "complementario" se refiere a una primera cadena de ácido nucleico capaz de formar enlaces de hidrógeno con una segunda cadena de ácido nucleico por Watson-Crick tradicional u otros tipos no tradicionales. Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de residuos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 siendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% complementario). La complementariedad "perfectamente complementaria" o 100% significa que todos los residuos contiguos de una secuencia de ácidos nucleicos formarán enlaces de hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda secuencia de ácidos nucleicos. La complementariedad menos que perfecta se refiere a la situación en la que algunos, pero no todos, los nucleótidos de dos cadenas pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. "Complementariedad sustancial" se refiere a cadenas de polinucleótidos que exhiben una complementariedad de 90% o más, excluyendo regiones de las cadenas de polinucleótidos, tales como voladizos, que se seleccionan para que no sean complementarias. La unión específica requiere un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica de la secuencia oligomérica a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, ensayos in vitro, en condiciones en las que se realizan los ensayos. Las secuencias no objetivo típicamente difieren en al menos 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la primera región específica de la sonda diana puede identificarse para su uso en la sonda informadora usando los métodos y sistemas informáticos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 8,415,102 de NanoString Technologies, Inc.

En algunas realizaciones, la primera región específica de la sonda diana y un marcador detectable se pueden acoplar entre sí mediante al menos uno o más enlazadores como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlazador entre la primera región específica de la sonda diana y el marcador detectable puede comprender un enlace amida. En algunas realizaciones, el enlazador entre la primera región específica de la sonda diana y el marcador detectable puede comprender un enlazador químico como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, las moléculas de marcación y/o marcación detectable pueden detectarse usando un microscopio epifluorescente. En algunas realizaciones, las moléculas de marcación y/o marcación detectable pueden detectarse usando un microscopio fluorescente.

En algunas realizaciones, el marcador detectable y/o las moléculas de marcado pueden detectarse mediante el uso de espectroscopía. Se pueden usar numerosos tipos de métodos espectroscópicos. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía ultravioleta, espectroscopía de luz visible, espectroscopía infrarroja, espectroscopía de rayos X, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de masas, resonancia de plasmones (por ejemplo, Cherif et al., Clinical Chemistry, 52: 255- 262 (2006) y la Patente de los Estados Unidos No. 7,030,989), espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía Raman, enfriamiento de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, fluorescencia intrínseca, fluorescencia de ligando y similares.

En algunas realizaciones, el marcador detectable y/o las moléculas de marcado pueden detectarse mediante el uso de anisotropía de fluorescencia. La anisotropía de fluorescencia se basa en la medición de la polarización en estado estacionario de la muestra de fluorescencia fotografiada en una disposición confocal. Una fuente de excitación láser polarizada linealmente excita preferentemente moléculas diana fluorescentes con momentos de transición alineados paralelos al vector de polarización incidente. La fluorescencia resultante se recoge y se dirige a dos canales que miden la intensidad de la fluorescencia polarizada tanto paralela como perpendicular a la del haz de excitación. Con estas dos mediciones, la anisotropía de fluorescencia, r , se puede determinar a partir de la ecuación: $r = (\text{Intensidad paralela} - \text{Intensidad perpendicular}) / (\text{Intensidad paralela} + 2 (\text{Intensidad perpendicular}))$ donde los términos I indican mediciones de intensidad paralelas y perpendiculares a la polarización incidente. Se ha descrito la detección de anisotropía fluorescente de moléculas fluorescentes. En consecuencia, la anisotropía de fluorescencia se puede acoplar a numerosos marcadores fluorescentes como se ha descrito aquí y como se ha descrito en la técnica.

En algunas realizaciones, las moléculas de marcación y/o marcaciones detectables pueden detectarse mediante el uso de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia se refiere a un mecanismo de transferencia de energía entre dos moléculas fluorescentes. Un donante fluorescente se excita con su longitud de onda de excitación fluorescente. Este estado excitado se transfiere de forma no radiactiva a una segunda molécula, el aceptor fluorescente. La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia se puede usar dentro de numerosas configuraciones para detectar el marcador detectable y/o las moléculas de marcado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una primera molécula marcadora puede marcarse con un donante fluorescente y la segunda molécula marcadora puede marcarse con un aceptor fluorescente. Por consiguiente, tales moléculas de marcación primera y segunda marcadas pueden usarse dentro de ensayos de competición para detectar la etiqueta y/o moléculas de marcación detectables. Se pueden utilizar numerosas combinaciones de donantes fluorescentes y aceptores fluorescentes para la detección.

En algunas realizaciones, las moléculas detectables y/o marcadoras pueden detectarse mediante el uso de análisis de polinucleótidos. Ejemplos de tales métodos incluyen, entre otros, los basados en hibridación de polinucleótidos, ligadura de polinucleótidos, amplificación de polinucleótidos, degradación de polinucleótidos y similares. Los métodos que utilizan colorantes de intercalación, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, detección capacitiva de ácido desoxirribonucleico y amplificación de ácido nucleico se han descrito, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos 7,118, 910 y 6,960,437). Dichos métodos se pueden adaptar para proporcionar la detección del marcador detectable y/o las moléculas de marcado. En algunas realizaciones, la extinción de fluorescencia, balizas moleculares, transferencia de electrones, conductividad eléctrica y similares se pueden usar para analizar la interacción de polinucleótidos. Dichos métodos son conocidos y se han descrito, por ejemplo, en Jarvius, DNA Tools and Microfluidic Systems for Molecular Analysis, Digital Comprehensive Summary of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 161, ACTA UNIVERSITATIS UPSALIENSIS UPPSALA 2006, ISBN: 91-554-6616-8; Singh-Zocchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci, 100: 7605-7610 (2003); Wang et al. Anal. Chem, 75: 3941-3945 (2003); and Fan et al., Proc. Natl. Acad. Sci, 100: 9134-9137 (2003) y en la Patente de los Estados Unidos No. 6,958,216; No. 5,093,268; y 6,090,545. En algunas realizaciones, el análisis de polinucleótidos es por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fundamentos de la PCR son bien conocidos por los expertos en la técnica, ver, por ejemplo, McPherson, et al., PCR, A Practical Approach, IRL Press, Oxford, Ing. (1991).

En algunas realizaciones, las sondas informadoras pueden comprender además una etiqueta de afinidad, que se describe en detalle en la sección "Sondas de captura" a continuación.

En algunas realizaciones, se coloca una etiqueta de afinidad cerca o en un extremo de la sonda informadora de modo que la unión de la sonda informadora a una superficie de sustrato sólido no interfiere significativamente con la detección del marcador detectable.

En algunas realizaciones, la(s) sonda(s) informadora(s) descrita en el presente documento se refiere a una "sonda informadora" o "sonda(s) de nanoinformador marcada" o "sonda(s) de nanoinformador" como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 8519115; y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Pub. Nos. 2014/0017688; US2014/0037620; US2013/0017971; US 2013/0230851; US 2011/0201515; US 2011/0086774; US 2011/0229888; y US 2010/0261026, todos los cuales están asignados a Nanostring Technologies, Inc.

Sonda de captura

Como se usa en este documento, el término "sonda de captura" generalmente se refiere a una molécula sintética que se une a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación de una sonda diana y opcionalmente comprende una etiqueta de afinidad. Como se usa en el presente documento, el término "etiqueta de afinidad" se refiere a una molécula que permite la inmovilización reversible o reversible de la sonda de captura y la secuencia de nucleótidos de identificación unida a una superficie de sustrato sólido, por ejemplo, para permitir la visualización y/o formación de imágenes del complejo unido. En algunas realizaciones, la inmovilización de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas puede proporcionar señales espaciales distinguibles que identifican las sondas de captura acopladas a las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas. Ejemplos de un sustrato sólido incluyen, pero no se limitan a, un dispositivo para microfluidos, un cartucho, una placa de microtitulación, un tubo, una partícula magnética, un andamio y una matriz.

La etiqueta de afinidad de la sonda de captura puede unirse a una superficie de sustrato sólido a través de una interacción covalente o no covalente. La inmovilización o unión de la etiqueta de afinidad a una superficie de sustrato sólido puede ocurrir de forma covalente o no covalente usando cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la inmovilización covalente se puede lograr mediante, por ejemplo, el acoplamiento de silano. Véase, por ejemplo, Weetall, 15 Adv. Mol. Cell Bio. 161 (2008); Weetall, 44 Meths. Enzymol 134 (1976). La interacción covalente entre la etiqueta de afinidad y la superficie del sustrato sólido también puede estar mediada por otras reacciones químicas reconocidas en la técnica, como la reacción de NHS o un agente de conjugación. La interacción no covalente entre la etiqueta de afinidad y la superficie del sustrato sólido se puede formar con base en interacciones iónicas, interacciones de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y/o interacciones de reconocimiento de forma.

En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad puede comprender un enlazador como se describe aquí. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad puede comprender un miembro de un par de moléculas de acoplamiento como se describe en la sección "enlazadores" a continuación. En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad puede comprender un miembro del par de acoplamiento biotina-avidina o biotina-estreptavidina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad puede comprender una molécula de biotina, mientras que la superficie sólida se puede acoplar con avidina y/o estreptavidina.

En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad puede comprender un enlazador físico. Por ejemplo, la etiqueta de afinidad puede comprender una partícula magnética, donde la etiqueta de afinidad se inmoviliza en una superficie de sustrato sólido bajo una fuerza magnética.

En algunas realizaciones, las sondas de captura tienen estructuras secundarias mínimas o nulas, como cualquier interacción estable de apareamiento de bases intramoleculares (por ejemplo, horquillas). Sin desear limitarse a la

teoría, la estructura secundaria mínima en las sondas de captura puede proporcionar una mejor hibridación entre el esqueleto de la sonda de captura y una parte de las secuencias de nucleótidos de identificación. Además, la estructura secundaria mínima en las sondas de captura puede proporcionar una mejor unión del complejo unido (es decir, un complejo que comprende una sonda de captura unida a una secuencia de nucleótidos de identificación) a una superficie de sustrato sólido. En algunas realizaciones, las sondas de captura descritas aquí no tienen apareamiento intramolecular significativo a una temperatura de fusión predeterminada. La temperatura de fusión predeterminada puede variar de aproximadamente 65°C-80°C o de aproximadamente 70°C-80°C o de aproximadamente 70°C-75°C.

En algunas realizaciones, la sonda de captura puede comprender una segunda región específica de la sonda diana que se une a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación de una sonda diana. En consecuencia, en algunas realizaciones, una sonda de captura puede comprender: (a) una segunda región específica de la sonda diana que se une a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y opcionalmente (b) una etiqueta de afinidad.

Como se usa en el presente documento, el término "segunda región específica de la sonda diana" se refiere a una región de una sonda de captura que se une a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación de una sonda diana. La segunda región específica de la sonda diana puede comprender un patrón espaciado bastante regularmente de un residuo de nucleótido y/o un grupo (por ejemplo, al menos 2 o más) de residuos de nucleótidos en la cadena principal. En algunas realizaciones, un residuo de nucleótido y/o un grupo (por ejemplo, al menos 2 o más) de residuos de nucleótido pueden estar separados al menos un promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 bases separadas dentro de la segunda región específica de la sonda diana. Esto permite una segunda región específica de la sonda diana que tiene un patrón regularmente espaciado de un nucleótido o un grupo de nucleótidos que se une a una secuencia de nucleótidos que tiene un nucleótido complementario o un grupo de nucleótidos complementarios regularmente separados por aproximadamente el mismo número de bases. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando la segunda región específica de la sonda diana contiene un patrón de residuos de adenina bastante espaciado regularmente en la columna vertebral, puede unirse a una secuencia de nucleótidos que tiene un residuo de timina bastante regularmente espaciado por aproximadamente el mismo número de bases.

En algunas realizaciones, al menos 30% o más (incluyendo, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 99% o 100%) de la segunda región específica de la sonda diana es complementaria a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación.

En algunas realizaciones, la segunda región específica de la sonda diana se puede identificar para usar en la sonda de captura usando los métodos y sistemas informáticos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 8,415,102 de NanoString Technologies, Inc.

En algunas realizaciones, la segunda región específica de la sonda diana y una etiqueta de afinidad se pueden acoplar entre sí por al menos uno o más enlazadores como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlazador entre la segunda región específica de la sonda diana y la etiqueta de afinidad puede comprender un enlace amida. En algunas realizaciones, el enlazador entre la segunda región específica de la sonda diana y la etiqueta de afinidad puede comprender un enlazador químico como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la(s) sonda(s) de captura descritas en el presente documento se refieren a una "sonda de captura" o "sonda de nanoinformador no etiquetada" o "sonda(s) de nanoinformador" como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 8519115; y la Solicitud Publicación de Patentes de los Estados Unidos Nos. 2014/0017688; 2014/0037620; US2013/0017971; US 2013/0230851; US 2011/0201515; US 2011/0086774; US 2011/0229888; y US 2010/0261026, todas las cuales están asignadas a Nanostring Technologies, Inc.

Cuando se utilizan sondas informadoras y sondas de captura en los métodos y/o sistemas descritos en este documento, la primera región específica de la sonda diana de una sonda informadora y la segunda región específica de la sonda diana de una sonda de captura deben hibridarse en una porción de una secuencia de identificación de nucleótidos en diferentes posiciones. Por ejemplo, las porciones de las secuencias de nucleótidos de identificación a las que hibridan las regiones específicas del objetivo del indicador y las sondas de captura pueden ser 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 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o más pares de bases separados.

Sistemas, por ejemplo, para la detección multiplexada de moléculas diana en una muestra

Se pueden llevar a cabo diversas realizaciones de los métodos descritos en este documento en uno o más módulos funcionales en un sistema o un sistema informático como se describe en este documento. Por consiguiente, en este documento se describe un sistema para la detección multiplexada de una pluralidad de moléculas diana en una muestra.

La Figura 18A representa un dispositivo o un sistema 600 informático que comprende uno o más procesadores 630 y una memoria 650 que almacena uno o más programas 620 para su ejecución por uno o más procesadores 630.

En algunas realizaciones, el dispositivo o sistema 600 informático puede comprender además un medio 700 de almacenamiento no transitorio legible por ordenador que almacena el uno o más programas 620 para su ejecución por uno o más procesadores 630 del dispositivo o sistema 600 informático.

En algunas realizaciones, el dispositivo o sistema 600 informático puede comprender además uno o más dispositivos de entrada 640, que pueden configurarse para enviar o recibir información a o desde cualquiera del grupo que consiste en: un dispositivo externo (no mostrado), el uno o más procesadores 630, la memoria 650, el medio de almacenamiento legible por ordenador 700 no transitorio, y uno o más dispositivos 660 de salida.

En algunas realizaciones, el dispositivo o sistema 600 informático puede comprender además uno o más dispositivos 660 de salida, que pueden configurarse para enviar o recibir información a o desde cualquiera del grupo que consiste en: un dispositivo externo (no mostrado), el uno o más procesadores 630, la memoria 650 y el medio 700 de almacenamiento legible por ordenador no transitorio.

En algunas realizaciones, el dispositivo o sistema 600 informático para la detección multiplexada de moléculas diana en una muestra comprende: uno o más procesadores; y memoria para almacenar uno o más programas, el uno o más programas que comprenden instrucciones para:

(a) recibir dicha al menos una muestra de prueba que comprende una muestra y una pluralidad de sondas diana descritas en el presente documento;

(b) liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana que están unidas a las moléculas diana en la muestra;

(c) detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas;

(d) determinar la presencia de una o más moléculas diana en la muestra en función de las señales detectadas realizando lo siguiente:

i) identificar las sondas detectables de las sondas informadoras que corresponden a las señales detectadas;

ii) identificar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana que corresponden a las sondas detectables con base en las primeras regiones específicas de la sonda diana de las sondas informadoras; y

iii) identificar las moléculas de unión a dianas que corresponden a las secuencias de nucleótidos de identificación; y

(e) mostrar un contenido basado en parte en la salida del análisis de dicho módulo de análisis, en donde el contenido comprende una señal indicativa de lo siguiente: (i) la presencia de una o más moléculas diana en la muestra, (ii) la ausencia de una o más moléculas diana en la muestra, y/o (iii) niveles de expresión de una o más moléculas diana en la muestra.

La Figura 18B representa un dispositivo o un sistema 600 (por ejemplo, un sistema informático) para obtener datos de al menos una muestra de prueba obtenida de al menos un sujeto. El sistema se puede utilizar para la detección multiplexada de moléculas diana en una muestra. El sistema comprende:

(a) al menos un módulo 601 de procesamiento de muestras que comprende instrucciones para recibir dicha al menos una muestra de prueba que comprende una muestra y una pluralidad de sondas diana descritas en el presente documento; y liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana que están unidas a las moléculas diana en la muestra;

(b) un módulo 602 de detección de señal que comprende instrucciones para detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas;

(c) al menos un módulo 604 de almacenamiento de datos que comprende instrucciones para almacenar las señales detectadas de (b) e información asociada con las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana;

(d) al menos un módulo 606 de análisis que comprende instrucciones para determinar la presencia de una o más moléculas diana en la muestra con base en las señales detectadas; y

(e) al menos un módulo 610 de visualización para mostrar un contenido basado en parte en la salida de análisis de dicho módulo de análisis, en donde el contenido comprende una señal indicativa de lo siguiente: (i) la presencia de una o más moléculas diana en la muestra, (ii) la ausencia de una o más moléculas diana en la muestra, y/o (iii) los niveles de expresión de una o más moléculas diana en la muestra.

En algunas realizaciones, el módulo 601 de procesamiento de muestra puede adaptarse para aislar células diana, como células individuales o como población, de la muestra. En algunas realizaciones, el módulo de procesamiento de

muestras puede comprender un dispositivo para microfluidos para la separación magnética de células diana o células interferentes de una muestra usando los métodos y dispositivos descritos en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2013/078332.

5 En algunas realizaciones, el módulo 601 de procesamiento de muestras puede comprender una placa de múltiples pozos (por ejemplo, 96 pozos, 384 pozos o nanopozos o micropozos) para análisis unicelulares.

10 En algunas realizaciones, el módulo 601 de procesamiento de muestra se puede adaptar para extraer moléculas de ácidos nucleicos de la misma muestra para análisis de ácidos nucleicos. Las técnicas para el análisis de ácidos nucleicos se conocen en la técnica y se pueden usar para analizar la muestra de prueba para determinar las medidas de expresión de genes o ácido nucleico, por ejemplo, pero sin limitarse a, secuenciación de ADN, secuenciación de ARN, secuenciación de novo, secuenciación de próxima generación tales como secuenciación de firma masivamente paralela (MPSS), secuenciación de colonias, secuenciación por pirocálisis, secuenciación Illumina (Solexa), secuenciación SOLiD, secuenciación de semiconductores iónicos, secuenciación por nanobalas de ADN, secuenciación de una sola molécula de Heliscope, secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT), secuenciación de ADN por nanoporos, secuenciación por hibridación, secuenciación con espectrometría de masas, secuenciación Sanger por microfluidos, técnicas de secuenciación basadas en microscopía, secuenciación de ARN polimerasa (RNAP) o cualquier combinación de las mismas.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el sistema descrito en el presente documento puede usarse para generar perfiles integrados, por ejemplo, perfiles de expresión de proteínas y moléculas de ácidos nucleicos a partir de la misma muestra.

20 En algunas realizaciones, el módulo 601 de procesamiento de muestra o el módulo 602 de detección de señal pueden comprender además instrucciones para contactar las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas con sondas informadoras descritas en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, el módulo 601 de procesamiento de muestra o el módulo 602 de detección de señal pueden comprender además instrucciones para poner en contacto las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas con las sondas de captura descritas en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, el módulo 601 de procesamiento de muestra o el módulo 602 de detección de señal pueden comprender además instrucciones para inmovilizar los nucleótidos de identificación liberados a un sustrato sólido a través de la etiqueta de afinidad descrita en este documento. Ejemplos de un sustrato sólido incluyen, entre otros, un dispositivo para microfluidos, un cartucho, un tubo, una placa de microtitulación, una partícula magnética y cualquier combinación de los mismos.

35 En algunas realizaciones, el módulo 606 de análisis puede comprender además instrucciones para (i) identificar las sondas detectables de las sondas informadoras que corresponden a las señales detectadas; (ii) identificar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana que corresponden a las sondas detectables con base en las primeras regiones específicas de la sonda diana de las sondas informadoras; y (iii) identificar las moléculas de unión a la diana que corresponden a las secuencias de nucleótidos de identificación, determinando así la presencia de una o más moléculas diana en la muestra en función de las señales detectadas.

En algunas realizaciones, el módulo 606 de análisis puede comprender además instrucciones para identificar una etiqueta detectable correspondiente a una pluralidad de señales de luz emitidas desde cada etiqueta detectable, en donde un orden espacial o temporal de la pluralidad de las señales de luz es único para cada etiqueta detectable.

40 En algunas realizaciones, el módulo 606 de análisis puede comprender además instrucciones para generar un umbral para las señales detectadas. Por ejemplo, las señales se pueden restringir con base en la unión no específica. En algunas realizaciones, el umbral es mayor que el de las señales de la unión no específica. Solo a modo de ejemplo, el umbral se puede determinar utilizando la desviación estándar y el error de medición de al menos una proteína de control. En algunas realizaciones, el umbral puede ser al menos 50% o más (incluyendo, por ejemplo, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o más) mayor que ese de las señales de la unión no específica. En algunas realizaciones, el umbral puede ser al menos 1.1 veces o más (incluyendo, por ejemplo, al menos 1.2 veces, al menos 1.3 veces, al menos 1.4 veces, al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, o superior) mayor que el de las señales de la unión no específica.

50 En algunas realizaciones, el módulo 606 de análisis puede comprender además instrucciones para cuantificar las señales normalizando las señales asociadas con las sondas diana mediante las señales asociadas con las sondas de control. En una realización, las señales se cuantifican y se expresan como el número de secuencias de nucleótidos de identificación detectadas por agente de unión a la diana.

55 Dependiendo de la naturaleza de las muestras de prueba y/o aplicaciones de los sistemas según lo deseen los usuarios, el módulo 610 de visualización puede mostrar además contenido adicional. En algunas realizaciones donde la muestra de prueba se recoge o deriva de un sujeto para evaluación diagnóstica, el contenido visualizado en el módulo 610 de visualización puede comprender además una señal indicativa de un diagnóstico de una afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno tal como cáncer).

En algunas realizaciones en las que la muestra de prueba se recoge o deriva de un sujeto para la selección y/o evaluación de un régimen de tratamiento para un sujeto, el contenido puede comprender además una señal indicativa de un régimen de tratamiento personalizado para el sujeto. En algunas realizaciones, el contenido puede comprender además una señal indicativa de la respuesta al tratamiento.

En este documento también se describe un medio 700 legible por ordenador tangible y no transitorio (por ejemplo, sin formas transitorias de transmisión de señal) que tiene instrucciones legibles por ordenador grabadas en él para definir módulos de software para implementar un método en un ordenador. En algunas realizaciones, el medio 700 legible por ordenador almacena uno o más programas para la detección multiplexada de moléculas diana en una muestra. El uno o más programas para la ejecución por uno o más procesadores de un sistema informático comprende (a) instrucciones para determinar la presencia de una o más moléculas diana en la muestra en función de las señales detectadas de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas realizando lo siguiente: (i) identificar las sondas detectables de las sondas informadoras que corresponden a las señales detectadas; (ii) identificar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana que corresponden a las sondas detectables con base en las primeras regiones específicas de la sonda diana de las sondas informadoras; y (iii) identificar las moléculas de unión a la diana que corresponden a las secuencias de nucleótidos de identificación; y (b) instrucciones para mostrar un contenido basado en parte en la salida de análisis de dicho módulo de análisis, en donde el contenido comprende una señal indicativa de lo siguiente: (i) la presencia de una o más moléculas diana en la muestra, (ii) la ausencia de una o más moléculas diana en la muestra, y/o (iii) los niveles de expresión de una o más moléculas diana en la muestra.

Dependiendo de la naturaleza de las muestras de prueba y/o aplicaciones de los sistemas según lo deseen los usuarios, el medio 700 de almacenamiento legible por ordenador puede comprender además instrucciones para mostrar contenido adicional. En algunas realizaciones en las que la muestra de prueba se recoge o deriva de un sujeto para evaluación diagnóstica, el contenido que se muestra en el módulo de visualización puede comprender además una señal indicativa de un diagnóstico de una afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) en el sujeto. En algunas realizaciones en las que la muestra de prueba se recoge o deriva de un sujeto para la selección y/o evaluación de un régimen de tratamiento para un sujeto, el contenido puede comprender además una señal indicativa de un régimen de tratamiento personalizado para el sujeto. En algunas realizaciones, el contenido puede comprender además una señal indicativa de la respuesta al tratamiento.

Las realizaciones de los sistemas descritos en este documento se han descrito a través de módulos funcionales, que se definen mediante instrucciones ejecutables por ordenador grabadas en medios legibles por ordenador y que hacen que un ordenador realice pasos de método cuando se ejecuta. Los módulos han sido segregados por función en aras de la claridad. Sin embargo, debe entenderse que los módulos no necesitan corresponder a bloques discretos de código y que las funciones descritas pueden llevarse a cabo mediante la ejecución de varias porciones de código almacenadas en diversos medios y ejecutadas en varios momentos. Además, debe apreciarse que los módulos pueden realizar otras funciones, por lo tanto, los módulos no se limitan a tener funciones particulares o un conjunto de funciones.

Los dispositivos informáticos incluyen típicamente una variedad de medios, que pueden incluir medios de almacenamiento legibles por ordenador y/o medios de comunicaciones, en los que estos dos términos se usan en este documento de manera diferente entre sí de la siguiente manera. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador o los medios legibles por ordenador (por ejemplo, 700) pueden ser cualquier medio tangible disponible (por ejemplo, medios de almacenamiento tangibles) a los que pueda acceder el ordenador, generalmente son de naturaleza no transitoria y pueden incluir tanto volátiles como medios no volátiles, medios extraíbles y no extraíbles. A modo de ejemplo, y sin limitación, los medios de almacenamiento legibles por ordenador se pueden implementar en conexión con cualquier método o tecnología para el almacenamiento de información, como instrucciones legibles por ordenador, módulos de programa, datos estructurados o datos no estructurados. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden incluir, entre otros, RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria de solo lectura), EEPROM (memoria de solo lectura programable borrable), memoria instantánea u otra tecnología de memoria, CD-ROM (disco compacto memoria de solo lectura), DVD (disco versátil digital) u otro almacenamiento de disco óptico, cintas magnéticas, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético, u otros medios tangibles y/o no transitorios que pueden usarse para almacenar la información deseada. Se puede acceder a los medios de almacenamiento legibles por ordenador mediante uno o más dispositivos informáticos locales o remotos, por ejemplo, a través de solicitudes de acceso, consultas u otros protocolos de recuperación de datos, para una variedad de operaciones con respecto a la información almacenada por el medio.

Por otro lado, los medios de comunicación típicamente incorporan instrucciones legibles por ordenador, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos estructurados o no estructurados en una señal de datos que puede ser transitoria tal como una señal de datos modulada, por ejemplo, una onda portadora u otro mecanismo de transporte, e incluye cualquier entrega de información o medios de transporte. El término "señal de datos modulada" o señales se refiere a una señal que tiene una o más de sus características establecidas o cambiadas de tal manera que codifique información en una o más señales. A modo de ejemplo, y sin limitación, los medios de comunicación incluyen medios cableados, como una red cableada o conexión directa, y medios inalámbricos como acústicos, radiofrecuencia (RF), infrarrojos y otros medios inalámbricos.

En algunas realizaciones, los medios 700 de almacenamiento legibles por ordenador pueden incluir el sistema "en la nube", en donde un usuario puede almacenar datos en un servidor remoto, y luego acceder a los datos o realizar un análisis adicional de los datos del servidor remoto.

Los datos legibles por ordenador incorporados en uno o más medios legibles por ordenador, o el medio 700 legible por ordenador, pueden definir instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas, que, como resultado de ser ejecutados por un ordenador, instruir a la ordenador para que realice una o más de las funciones descritas en el presente (por ejemplo, en relación con el sistema 600, o el medio 700 legible por ordenador), y/o diversas realizaciones, variaciones y combinaciones de las mismas. Dichas instrucciones pueden escribirse en cualquiera de una pluralidad de lenguajes de programación, por ejemplo, Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje ensamblador COBOL y similares, o cualquiera de variedad de combinaciones de los mismos. Los medios legibles por ordenador en los que se incorporan tales instrucciones pueden residir en uno o más de los componentes del sistema 600, o el medio 700 legible por ordenador descrito en este documento, pueden distribuirse a través de uno o más de dichos componentes y pueden estar en transición hay entre ellos.

Los medios legibles por ordenador pueden ser transportables de tal manera que las instrucciones almacenadas allí pueden cargarse en cualquier recurso informático para implementar los ensayos y/o métodos descritos aquí. Además, debe apreciarse que las instrucciones almacenadas en el medio legible por ordenador, o el medio 700 legible por ordenador, descrito anteriormente, no se limitan a instrucciones incorporadas como parte de un programa de aplicación que se ejecuta en un ordenador host. Por el contrario, las instrucciones pueden incorporarse como cualquier tipo de código de ordenador (por ejemplo, software o microcódigo) que puede emplearse para programar un ordenador para implementar los ensayos y/o métodos descritos aquí. Las instrucciones ejecutables del ordenador pueden estar escritas en un lenguaje de ordenador adecuado o en una combinación de varios idiomas. Los expertos en la técnica conocen los métodos básicos de biología computacional y se describen, por ejemplo, en Setubal and Meidanis et al., *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi and Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, London, 2000) y Ouelette and Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2nd ed., 2001).

Los módulos funcionales de ciertas realizaciones del sistema o sistema informático descritos en el presente documento pueden incluir un módulo de procesamiento de muestras, un módulo de detección de señal, un dispositivo de almacenamiento, un módulo de análisis y un módulo de visualización. Los módulos funcionales se pueden ejecutar en una o varias ordenadores, o mediante el uso de una o varias redes de ordenadores. El módulo 602 de detección de señal puede tener instrucciones ejecutables por ordenador para detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas.

En algunas realizaciones, el módulo 602 de detección de señal puede tener instrucciones ejecutables por ordenador para proporcionar información de secuencia en forma legible por ordenador, por ejemplo, para la secuenciación de ARN. En estas realizaciones, el sistema puede permitir mediciones simultáneas de moléculas diana (por ejemplo, proteínas) y moléculas de ácidos nucleicos de la misma muestra. Por ejemplo, los perfiles de expresión integrados de las proteínas y las moléculas de ácidos nucleicos se pueden usar para estudiar proteínas que interactúan con elementos reguladores genéticos como los microARN. Como se usa en el presente documento, "información de secuencia" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos, que incluye, pero no se limita a secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de longitud completa, secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos parciales, o secuencias mutadas. Además, la información "relacionada con" la información de secuencia incluye la detección de la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, detección de una mutación o eliminación), determinación de la concentración de una secuencia en la muestra (por ejemplo, niveles de expresión de secuencia de aminoácidos, o niveles de expresión de nucleótidos (ARN o ADN), y similares. El término "información de secuencia" pretende incluir la presencia o ausencia de modificaciones postraducción (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, sumilación, farnesilación y similares).

Como ejemplo, los módulos de detección de señal 602 para determinar la información de secuencia pueden incluir sistemas conocidos para análisis de secuencia automatizado que incluyen pero no se limitan a escáneres fluorescentes Hitachi FMBIO® e Hitachi FMBIO® II (disponibles de Hitachi Genetic Systems, Alameda, California); Spectrumedix® SCE 9610 Fully Automated 96Capillary Electrophoresis Genetic Analysis Systems (disponibles en SpectruMedix LLC, State College, Pennsylvania); ABI PRISM® 377 DNA Sequencer, ABI® 373 DNA Sequencer, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer and ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (disponible en Applied Biosystems, Foster City, California); Molecular Dynamics FluorImager™ 575, SI Fluorescent Scanners, y Molecular Dynamics FluorImager™ 595 (disponibles en Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra); GenomymxSC™ DNA Sequencing System (disponible de Genomymx Corporation (Foster City, California); y Pharmacia ALF™ DNA Sequencer y Pharmacia ALFexpress™ (disponible de Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

Los métodos alternativos para determinar la información de secuencia, es decir, los módulos de detección de señal 602, incluyen sistemas para análisis de proteínas y ADN. Por ejemplo, los sistemas de espectrometría de masas, incluidos los sistemas de ionización por desorción láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y los sistemas de perfiles de matriz ProteinChip SELDI-TOF-MS; sistemas para analizar datos de expresión génica (véase,

por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos publicada No. U.S. 2003/0194711); sistemas para análisis de expresión basados en matriz: por ejemplo, sistemas de matriz HT y sistemas de matriz de cartucho como GeneChip® AutoLoader, Complete GeneChip® Instrument System, GeneChip® Fluidics Station 450, GeneChip® Hybridization Oven 645, GeneChip® QC Toolbox Software Kit, GeneChip® Scanner Sistema de genotipificación dirigido 3000 7G plus, escáner GeneChip® Sistema de asociación de genoma completo 3000 7G, instrumento GeneTitan™ y estación de matriz GeneChip® (cada uno disponible en Affymetrix, Santa Clara, California); sistemas ELISA automatizados (por ejemplo, DSX® o DS2® (disponible de Dynax, Chantilly, VA) o Triturus® (disponible de Grifols USA, Los Ángeles, California), The Mago® Plus (disponible de Diamedix Corporation, Miami, Florida); densitómetros (por ejemplo, X-Rite-508-Spectro Densitometer® (disponible de RP Imaging™, Tucson, Arizona), el densitómetro HYRYS™ 2 HIT (disponible de Sebia Electrophoresis, Norcross, Georgia); sistemas de hibridación de fluorescencia automatizados in situ (véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 6,136,540); sistemas de imágenes en gel 2D junto con software de imágenes en 2-D; lectores de microplacas; clasificadores de células activadas por fluorescencia (FACS) (por ejemplo, citómetro de flujo FACSVantage SE, (disponible en Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey) y analizadores de isótopos de radio (por ejemplo, contadores de centelleo).

Las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas determinadas en el módulo de detección de señales pueden ser leídas por el dispositivo 604 de almacenamiento. Como se usa en este documento, el "dispositivo 604 de almacenamiento" está destinado a incluir cualquier aparato informático o de procesamiento adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para su uso con el sistema aquí descrito pueden incluir aparatos informáticos independientes, redes de telecomunicaciones de datos, incluidas redes de área local (LAN), redes de área amplia (WAN), Internet, Intranet y Extranet, y sistemas de procesamiento informáticos locales y distribuidos. Los dispositivos 604 de almacenamiento también incluyen, entre otros: medios de almacenamiento magnéticos, como disquetes, medios de almacenamiento de discos duros, cintas magnéticas, medios de almacenamiento óptico como CD-ROM, DVD, medios de almacenamiento electrónico como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, discos duros generales e híbridos de estas categorías, tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos. El dispositivo 604 de almacenamiento está adaptado o configurado para haber registrado en él información de secuencia o información de nivel de expresión. Dicha información se puede proporcionar en forma digital que se puede transmitir y leer electrónicamente, por ejemplo, a través de Internet, en disquete, a través de USB (bus en serie universal) o mediante cualquier otro modo de comunicación adecuado, por ejemplo, la "nube".

Como se usa en el presente documento, "información de nivel de expresión" se refiere a niveles de expresión de cualquier molécula diana a medir, por ejemplo, pero sin limitación, proteínas, péptidos, lípidos, metabolitos, carbohidratos, toxinas, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, células, y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la información del nivel de expresión se puede determinar a partir de las señales detectadas de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas correspondientes a cada molécula diana.

Como se usa en el presente documento, "almacenamiento" se refiere a un proceso para codificar información en el dispositivo 604 de almacenamiento. Los expertos en la materia pueden adoptar fácilmente cualquiera de los métodos actualmente conocidos para registrar información en medios conocidos para generar fabricantes que comprenden la información de secuencia o información de nivel de expresión.

Se puede usar una variedad de programas y formatos de software para almacenar la información de secuencia o información de nivel de expresión en el dispositivo de almacenamiento. Se puede emplear cualquier número de formatos de estructuración del procesador de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) para obtener o crear un medio que haya grabado en él la información de secuencia o información de nivel de expresión.

Al proporcionar información de secuencia y/o información de nivel de expresión en forma legible por ordenador, se puede usar la información de secuencia y/o información de nivel de expresión en forma legible en el módulo 606 de análisis para generar perfiles de expresión para la muestra que se está probando. El análisis realizado en forma legible por ordenador proporciona un resultado de análisis legible por ordenador que puede procesarse por una variedad de medios. El contenido 608 basado en el resultado del análisis se puede recuperar del módulo 606 de análisis para indicar la presencia o ausencia de una o más moléculas diana presentes en una muestra.

El "módulo de análisis" 606 puede usar una variedad de programas y formatos de software disponibles para calcular los perfiles de expresión de diversas moléculas diana. En una realización, el módulo 606 de análisis puede calcular los perfiles de expresión proteómica como sigue. Primero, los recuentos sin procesar de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas se pueden normalizar primero utilizando el software de análisis nSolver para tener en cuenta las diferencias de hibridación en un cartucho, antes de la normalización a través de la media de los controles positivos internos, que explican la eficiencia de la hibridación. Estos recuentos se pueden convertir en valores de expresión usando los recuentos relativos de secuencias de nucleótidos de identificación por un agente de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo). A continuación, se puede restar la señal de fondo promedio de la IgG de control. Los genes de limpieza pueden usarse para la normalización que explica las variaciones en el número de células. Las señales se pueden normalizar a través de una proteína de limpieza, por ejemplo, GAPDH, actina y/o β -tubulina.

En algunas realizaciones, el módulo 606 de análisis puede comprender, por ejemplo, MATLAB o funcionalmente equivalente del mismo para generar mapas de calor y clustergramas con una entrada de matriz de valores de expresión

de marcador que se calcularon como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, los clustergramas pueden realizarse como un enlace ponderado. En algunas realizaciones, los clustergramas pueden agruparse usando valores de correlación como una métrica de distancia. Si una molécula diana no era detectable, se puede eliminar de la matriz o mapa de calor y no se muestra.

- 5 En algunas realizaciones, el módulo 606 de análisis puede comprender uno o más programas para analizar sondas informadoras y/o sondas de captura como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 7,941,279 de NanoString Technologies, Inc.

En algunas realizaciones, el módulo 606 de análisis puede comparar perfiles de expresión de proteínas. Se puede usar cualquier software de comparación disponible, incluidos, entre otros, el paquete Ciphergen Express (CE) y Biomarker Patterns Software (BPS) (disponible en Ciphergen Biosystems, Inc., Freemont, California). El análisis comparativo se puede hacer con el software del sistema de chip de proteína (por ejemplo, The Protein chip Suite (disponible en Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Los algoritmos para identificar perfiles de expresión pueden incluir el uso de algoritmos de optimización como el algoritmo de varianza media (por ejemplo, Algoritmo de JMP Genomics disponible de JMP Software Cary, Carolina del Norte).

15 El módulo 606 de análisis, o cualquier otro módulo del sistema descrito aquí, puede incluir un sistema operativo (por ejemplo, UNIX) en donde se ejecuta un sistema de gestión de base de datos relacional, una aplicación de World Wide Web y un servidor de World Wide Web. La aplicación World Wide Web incluye el código ejecutable necesario para la generación de declaraciones de lenguaje de base de datos (por ejemplo, declaraciones de Lenguaje de Consulta Estructurado (SQL)). En general, los ejecutables incluirán declaraciones SQL incrustadas. Además, la aplicación World Wide Web puede incluir un archivo de configuración que contiene punteros y direcciones a las diversas entidades de software que comprenden el servidor, así como a las diversas bases de datos externas e internas a las que se debe acceder para atender las solicitudes de los usuarios. El archivo de configuración también dirige las solicitudes de recursos del servidor al hardware apropiado, ya que puede ser necesario si el servidor se distribuye en dos o más ordenadores separados. En una realización, el servidor de la World Wide Web admite un protocolo TCP/IP. Las redes locales como esta a veces se denominan "Intranets". Una ventaja de tales Intranets es que permiten una fácil comunicación con las bases de datos de dominio público que residen en la World Wide Web (por ejemplo, el sitio GenBank o Swiss Pro World Wide Web). Por lo tanto, en una realización particular, los usuarios pueden acceder directamente a los datos (a través de enlaces de hipertexto, por ejemplo) que residen en bases de datos de Internet utilizando una interfaz HTML proporcionada por navegadores web y servidores web. En otra realización, los usuarios pueden acceder directamente a los datos que residen en la "nube" proporcionada por los proveedores de servicios de computación en la nube.

El módulo 606 de análisis proporciona un resultado de análisis legible por ordenador que puede procesarse en forma legible por ordenador mediante criterios predefinidos, o criterios definidos por un usuario, para proporcionar un contenido basado en parte en el resultado del análisis que puede almacenarse y enviarse según lo solicitado por un usuario que utiliza un módulo 610 de visualización. El módulo 610 de visualización permite la visualización de un contenido 608 basado en parte en el resultado de comparación para el usuario, en donde el contenido 608 es una señal indicativa de la presencia de una o más moléculas diana en la muestra, una señal indicativa de la ausencia de una o más moléculas diana en la muestra, una señal indicativa de los niveles de expresión de una o más moléculas diana en la muestra, o cualquier combinación de las mismas. Dicha señal puede ser, por ejemplo, una visualización del contenido 608 en un monitor de ordenador, una página impresa del contenido 608 desde una impresora, o una luz o sonido indicativo de la ausencia de una molécula diana en una muestra.

En diversas realizaciones del sistema informático descrito aquí, el módulo 606 de análisis puede integrarse en el módulo 602 de detección de señal.

Dependiendo de la naturaleza de las muestras de prueba y/o aplicaciones de los sistemas según lo deseen los usuarios, el contenido 608 basado en el resultado del análisis también puede incluir una señal indicativa de un diagnóstico de una afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) en el tema. En algunas realizaciones, el contenido 608 basado en el resultado del análisis puede comprender además una señal indicativa de un régimen de tratamiento personalizado para el sujeto. En algunas realizaciones, el contenido 608 basado en el resultado del análisis puede comprender además una señal indicativa de una respuesta de un sujeto a un tratamiento, que proporciona un medio de monitorizar la respuesta al tratamiento en un sujeto.

En algunas realizaciones, el contenido 608 basado en el resultado del análisis puede incluir una representación gráfica que refleja los perfiles de expresión de las moléculas diana, por ejemplo, como se muestra en la Figura 5.

En una realización, el contenido 608 basado en el resultado del análisis se muestra en un monitor de ordenador. En una realización, el contenido 608 basado en el resultado del análisis se muestra a través de medios imprimibles. El módulo 610 de visualización puede ser cualquier dispositivo adecuado configurado para recibir de un ordenador y mostrar información legible por ordenador a un usuario. Ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, ordenadores de uso general, como las que se basan en el procesador de tipo Intel PENTIUM, Motorola PowerPC, Sun UltraSPARC, procesadores PA-RISC Hewlett-Packard, cualquiera de una variedad de procesadores disponibles de Advanced Micro

Devices (AMD) de Sunnyvale, California, o cualquier otro tipo de procesador, dispositivos de observación visual como pantallas planas, tubos de rayos catódicos y similares, así como impresoras de ordenador de varios tipos.

En algunas realizaciones, el contenido puede mostrarse en una pantalla de ordenador, una pantalla, un monitor, un correo electrónico, un mensaje de texto, un sitio web, una impresión física (por ejemplo, papel), o proporcionarse como información almacenada en un dato dispositivo de almacenamiento.

En una realización, se usa un navegador de World Wide Web para proporcionar una interfaz de usuario para la visualización del contenido 608 basado en el resultado del análisis. Debe entenderse que otros módulos del sistema descritos en este documento pueden adaptarse para tener una interfaz de navegador web. A través del navegador web, un usuario puede construir solicitudes para recuperar datos del módulo de análisis. Por lo tanto, el usuario típicamente apuntará y hará clic en elementos de la interfaz de usuario tales como botones, menús desplegables, barras de desplazamiento y similares empleados convencionalmente en las interfaces gráficas de usuario. Las solicitudes formuladas de esta manera con el navegador web del usuario se transmiten a una aplicación web que las formatea para producir una consulta que puede emplearse para extraer la información pertinente relacionada con el perfil de expresión de las moléculas diana en una muestra, por ejemplo, una indicación de la presencia o ausencia de una o más moléculas diana en la muestra, o la visualización de información basada en ella. En una realización, también se muestra la información de la referencia de control.

En cualquier realización, el módulo de análisis puede ejecutarse mediante un software implementado por ordenador como se discutió anteriormente. En tales realizaciones, un resultado del módulo de análisis puede mostrarse en una pantalla electrónica. El resultado puede mostrarse mediante gráficos, números, caracteres o palabras. En realizaciones adicionales, los resultados del módulo de análisis pueden transmitirse desde una ubicación a al menos otra ubicación. Por ejemplo, los resultados de la comparación se pueden transmitir a través de cualquier medio electrónico, por ejemplo, Internet, fax, teléfono, un sistema "en la nube" y cualquier combinación de los mismos. Usando el sistema "en la nube", los usuarios pueden almacenar y acceder a archivos y datos personales o realizar análisis adicionales en un servidor remoto en lugar de transportar físicamente un medio de almacenamiento como un DVD o una unidad de memoria USB.

Cada uno de los módulos o programas identificados anteriormente corresponde a un conjunto de instrucciones para realizar una función descrita anteriormente. Estos módulos y programas (es decir, conjuntos de instrucciones) no necesitan implementarse como programas de software, procedimientos o módulos separados, y, por lo tanto, varios subconjuntos de estos módulos pueden combinarse o reorganizarse de otra manera en diversas realizaciones. En algunas realizaciones, la memoria puede almacenar un subconjunto de los módulos y estructuras de datos identificados anteriormente. Además, la memoria puede almacenar módulos adicionales y estructuras de datos no descritas anteriormente.

Los aspectos ilustrados de la divulgación también se pueden practicar en entornos informáticos distribuidos donde ciertas tareas son realizadas por dispositivos de procesamiento remoto que están vinculados a través de una red de comunicaciones. En un entorno informático distribuido, los módulos de programa pueden ubicarse en dispositivos de almacenamiento de memoria local y remota.

Además, debe apreciarse que diversos componentes descritos en el presente documento pueden incluir circuitos eléctricos que pueden incluir componentes y elementos de circuitos de valor adecuado para implementar las realizaciones de las innovaciones objeto. Además, se puede apreciar que muchos de los diversos componentes se pueden implementar en uno o más chips de circuito integrado (IC). Por ejemplo, en una realización, se puede implementar un conjunto de componentes en un solo chip IC. En otras realizaciones, uno o más de los componentes respectivos se fabrican o implementan en chips IC separados.

Lo que se ha descrito anteriormente incluye ejemplos de las realizaciones del sistema aquí descrito. Por supuesto, no es posible describir todas las combinaciones concebibles de componentes o metodologías con el fin de describir la materia reivindicada, pero se debe apreciar que son posibles muchas otras combinaciones y permutaciones de la innovación de la materia. En consecuencia, el objeto reivindicado pretende abarcar todas las alteraciones, modificaciones y variaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, la descripción anterior de las realizaciones ilustradas de la divulgación del tema, incluido lo que se describe en el Resumen, no pretende ser exhaustiva o limitar las realizaciones divulgadas a las formas precisas divulgadas. Si bien en el presente documento se describen realizaciones y ejemplos específicos con fines ilustrativos, son posibles diversas modificaciones que se consideran dentro del alcance de tales realizaciones y ejemplos, como pueden reconocer los expertos en la técnica relevante.

En particular y con respecto a las diversas funciones realizadas por los componentes, dispositivos, circuitos, sistemas y similares descritos anteriormente, los términos utilizados para describir dichos componentes están destinados a corresponder, a menos que se indique lo contrario, a cualquier componente que realice la función especificada del componente descrito (por ejemplo, un equivalente funcional), aunque no sea estructuralmente equivalente a la estructura descrita, que realiza la función en los aspectos de ejemplo ilustrados en el presente documento de la materia reivindicada. A este respecto, también se reconocerá que la innovación incluye un sistema, así como un medio de

almacenamiento legible por ordenador que tiene instrucciones ejecutables por ordenador para realizar los actos y/o eventos de los diversos métodos del tema reclamado.

Los sistemas/circuitos/módulos mencionados anteriormente se han descrito con respecto a la interacción entre varios componentes/bloques. Se puede apreciar que tales sistemas/circuitos y componentes/bloques pueden incluir esos componentes o subcomponentes especificados, algunos de los componentes o subcomponentes especificados, y/o componentes adicionales, y de acuerdo con diversas permutaciones y combinaciones de los anteriores. Los subcomponentes también se pueden implementar como componentes acoplados comunicativamente a otros componentes en lugar de incluirse dentro de los componentes principales (jerárquico). Además, debe tenerse en cuenta que uno o más componentes se pueden combinar en un solo componente que proporciona funcionalidad agregada o dividirse en varios subcomponentes separados, y se puede proporcionar una o más capas intermedias, como una capa de gestión, para unir comunicativamente a dichos subcomponentes para proporcionar una funcionalidad integrada. Cualquier componente descrito en el presente documento también puede interactuar con uno o más componentes no descritos específicamente en el presente documento, pero conocidos por los expertos en la materia.

Además, aunque una característica particular de la innovación en cuestión puede haberse revelado con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica se puede combinar con una o más características de las otras implementaciones que se deseen y sean ventajosas para cualquier aplicación dada o particular. Además, en la medida en que los términos "incluye", "que incluye", "tiene", "contiene", variantes de los mismos y otras palabras similares se usan en la descripción detallada o en las reivindicaciones, estos términos tienen la intención de ser inclusivos en de manera similar al término "que comprende" como una palabra de transición abierta sin excluir ningún elemento adicional u otro.

Tal como se usa en esta solicitud, los términos "componente", "módulo", "sistema" o similares generalmente se refieren a una entidad relacionada con la ordenador, ya sea hardware (por ejemplo, un circuito), una combinación de hardware y software, software o una entidad relacionada con una máquina operativa con una o más funcionalidades específicas. Por ejemplo, un componente puede ser, entre otros, un proceso que se ejecuta en un procesador (por ejemplo, un procesador de señal digital), un procesador, un objeto, un ejecutable, un hilo de ejecución, un programa y/o un ordenador. A modo de ilustración, tanto una aplicación que se ejecuta en un controlador como el controlador pueden ser un componente. Uno o más componentes pueden residir dentro de un proceso y/o subproceso de ejecución y un componente puede localizarse en un ordenador y/o distribuirse entre dos o más ordenadores. Además, un "dispositivo" puede venir en forma de hardware especialmente diseñado; hardware generalizado hecho especializado por la ejecución de software al respecto que permite que el hardware realice una función específica; software almacenado en un medio legible por ordenador; o una combinación de los mismos.

En vista de los sistemas de ejemplo descritos anteriormente, las metodologías que pueden implementarse de acuerdo con el tema descrito se apreciarán mejor con referencia a los diagramas de flujo de las diversas figuras. Para simplificar la explicación, las metodologías se representan y describen como una serie de actos. Sin embargo, los actos de acuerdo con esta divulgación pueden ocurrir en varias órdenes y/o simultáneamente, y con otros actos no presentados y descritos aquí. Además, no todos los actos ilustrados pueden ser necesarios para implementar las metodologías de acuerdo con el tema revelado. Además, los expertos en la materia comprenderán y apreciarán que las metodologías podrían representarse alternativamente como una serie de estados interrelacionados a través de un diagrama de estado o eventos. Además, debe apreciarse que las metodologías descritas en esta especificación pueden almacenarse en un artículo de fabricación para facilitar el transporte y la transferencia de tales metodologías a dispositivos informáticos. El término artículo de fabricación, como se usa en este documento, pretende abarcar un programa informático accesible desde cualquier dispositivo legible por ordenador o medio de almacenamiento.

El sistema 600 y el medio 700 legible por ordenador son realizaciones meramente ilustrativas, por ejemplo, para la detección multiplexada de moléculas diana en una muestra y/o para su uso en los métodos de diversos aspectos descritos en este documento. Son posibles variaciones del sistema 600 y del medio 700 legible por ordenador.

Los módulos de la máquina, o utilizados en el medio legible por ordenador, pueden asumir numerosas configuraciones. Por ejemplo, la función puede proporcionarse en una sola máquina o distribuirse en múltiples máquinas.

Kits, por ejemplo, para la detección multiplexada de moléculas diana en una muestra

También se describen kits, por ejemplo, para la detección multiplexada de diferentes moléculas diana de una muestra. En algunas realizaciones, el kit comprende (a) una pluralidad de sondas diana de acuerdo con una o más realizaciones descritas en el presente documento; y (b) una pluralidad de sondas informadoras de acuerdo con una o más realizaciones descritas en este documento.

En algunas realizaciones, cada subconjunto de las sondas diana en la pluralidad se une a una molécula diana diferente, en donde las sondas diana en el subconjunto comprenden la misma molécula de unión a diana. Es decir, no hay dos sondas diana en el subconjunto que se una a diferentes regiones de la misma molécula diana.

En algunas realizaciones, el kit comprende al menos 3 o más (incluyendo al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos al menos 60, al menos 70, al menos 80, al

menos 90, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250 o más) diferentes sondas diana descritas en este documento, en donde cada sonda diana se une específicamente a una molécula diana diferente. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el kit comprende además al menos 3 o más (incluyendo al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250 o más) sondas informadoras diferentes, en las que cada sonda informadora identifica una sonda diana distinta.

En algunas realizaciones, dependiendo del diseño de las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana, el kit puede comprender además al menos una o más (incluyendo al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15, a captura de 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, al menos 150, al menos 200, al menos 250 o más) sondas descritas en este documento. En algunas realizaciones, puede usarse la misma sonda de captura, por ejemplo, para la inmovilización de diferentes secuencias de nucleótidos de identificación en una superficie de sustrato sólido para visualización y/o formación de imágenes. En algunas realizaciones, se pueden usar diferentes sondas de captura, por ejemplo, para la inmovilización de diferentes secuencias de nucleótidos de identificación en una superficie de sustrato sólido para visualización y/o formación de imágenes.

En algunas realizaciones, las sondas informadoras y las sondas de captura pueden proporcionarse en el kit individualmente o en una mezcla.

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a la diana de las sondas diana pueden comprender anticuerpos o fragmentos de los mismos. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden seleccionar de la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el enlazador escindible de las sondas diana puede comprender un enlazador fotoescindible. En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible se puede seleccionar de las moléculas (i)-(xiv) como se muestra anteriormente. En algunas realizaciones, el enlazador fotoescindible puede comprender la molécula (xiv).

En algunas realizaciones, el marcador detectable de las sondas informadoras puede comprender una o más moléculas marcadoras que crean una señal única para cada sonda informadora. Una señal única de ejemplo puede ser una señal óptica. La señal óptica puede comprender una o una serie o una secuencia de señales emisoras de luz. En estas realizaciones, ejemplos no limitantes de las moléculas marcadoras incluyen unidades estructurales fluorocromos, unidades estructurales fluorescentes, unidades estructurales colorantes, unidades estructurales quimioluminiscentes y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además una pluralidad de (por ejemplo, al menos 2 o más, que incluyen, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o más) sondas de control de acuerdo con una o más realizaciones descritas en este documento.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además reactivos para detectar una pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos. Los reactivos de ejemplo para la detección y análisis de ácidos nucleicos pueden incluir, pero no se limitan a, polimerasa de ácidos nucleicos, cebadores, nucleótidos, un agente para la extracción de ácido nucleico, una solución regulada, secuencias de control de ácido nucleico y cualquier combinación de los mismos. Dicho kit se puede usar para generar un perfil integrado que combina tanto la molécula diana (por ejemplo, proteínas) como la información del material genético (por ejemplo, ADN, ARN, epigenética y microARN). Por lo tanto, el kit se puede utilizar para estudiar moléculas diana que interactúan con materiales genéticos como elementos reguladores genéticos.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además al menos un reactivo para uso en una o más realizaciones de los métodos o sistemas descritos en el presente documento. Los reactivos que se pueden proporcionar en el kit pueden incluir al menos uno o más de los siguientes: un reactivo de hibridación, un reactivo de purificación, un reactivo de inmovilización, un agente de formación de imágenes, un agente de permeabilización celular, un agente de bloqueo, un agente de escisión para el enlazador de escisión, y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el kit puede incluir además al menos uno o más dispositivos (por ejemplo, cartuchos de muestra o dispositivos para microfluidos) o tubos para usar en una o más realizaciones de los métodos y/o sistemas descritos aquí. En algunas realizaciones, el dispositivo puede comprender una superficie para la inmovilización de las sondas de captura tras el acoplamiento a las secuencias de nucleótidos de identificación. En algunas realizaciones, el dispositivo puede comprender un dispositivo para microfluidos para separar células diana de células interferentes como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un dispositivo para microfluidos para la separación magnética de células diana o células interferentes de una muestra como se describe en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2013/078332 se puede incluir en el kit.

En algunas realizaciones, el kit puede incluir además un medio de almacenamiento legible por ordenador (no transitorio) de acuerdo con una o más realizaciones descritas en este documento. Por ejemplo, en una realización, el medio de almacenamiento legible por ordenador (no transitorio) incluido en el kit puede proporcionar instrucciones para determinar los niveles de presencia o expresión de una o más moléculas diana en una muestra. El medio de almacenamiento legible por ordenador (no transitorio) puede estar en un CD, DVD y/o unidad USB.

En todas estas realizaciones del aspecto, el kit incluye los materiales de embalaje necesarios y el material informativo para almacenar y usar dichos kits. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de marketing u otro material relacionado con los métodos descritos aquí y/o el uso de uno o varios agentes descritos aquí para los métodos descritos aquí. En una realización, el material informativo puede incluir instrucciones para realizar una detección multiplexada de moléculas diana en una muestra. En una realización, el material de información puede incluir instrucciones para analizar las lecturas de señal.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en forma impresa, por ejemplo, un texto impreso, un dibujo y/o una fotografía, por ejemplo, una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, como Braille, material legible por ordenador, grabación de video o grabación de audio. En otra realización, el material informativo del kit es información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, sitio web o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustancial sobre un compuesto descrito en este documento y/o su uso en los métodos descritos aquí. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

En todas las realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, el kit se proporcionará típicamente con sus diversos elementos incluidos en un paquete, por ejemplo, a base de fibra, por ejemplo, un cartón o polimérico, por ejemplo, una caja de espuma de poliestireno. El recinto se puede configurar para mantener un diferencial de temperatura entre el interior y el exterior, por ejemplo, puede proporcionar propiedades aislantes para mantener los reactivos a una temperatura preseleccionada durante un tiempo preseleccionado. El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene uno o más compuestos descritos aquí. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes separados (por ejemplo, dos recipientes separados para los dos agentes), divisores o compartimentos para la(s) composición(es) y material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida 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 contenedor único, no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que ha unido al material informativo en forma de etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de contenedores individuales, cada uno de los cuales contiene una o más formas de uso unitario de sondas diana descritas en este documento. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de aluminio o paquetes de blíster, cada uno de los cuales contiene un uso unitario de las sondas diana descritas aquí. Los contenedores de los kits pueden ser herméticos, impermeables (por ejemplo, impermeables a los cambios de humedad o evaporación) y/o herméticos a la luz.

Usos de ejemplo de los métodos, sistemas y kits descritos aquí

Los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse en cualquier aplicación en la que sea deseable la detección de una pluralidad de moléculas diana en una muestra. Por ejemplo, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra de una fuente ambiental (por ejemplo, agua, suelo, productos alimenticios y/o estanques). Otras muestras que se pueden analizar con los métodos, sistemas y kits descritos en este documento se analizan en la sección "Muestra" a continuación.

Los inventores han demostrado que, en una realización, un código de barras de anticuerpos con la plataforma de ADN fotoescindible (ABCD) descrita en el presente documento puede permitir el análisis de cientos de proteínas de una sola célula o un número limitado de células, por ejemplo, de aspirados de aguja fina mínimamente invasivos. (FNA). En consecuencia, las muestras susceptibles de los métodos descritos en el presente documento pueden comprender menos de 500 células o menos. En algunas realizaciones, la muestra puede comprender menos de 400 células, menos de 300 células, menos de 200 células, menos de 100 células, menos de 50 células, menos de 25 células, menos de 5 células o menos. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra unicelular. En algunas realizaciones, la muestra puede comprender células aisladas de un aspirado con aguja fina.

Cuando la muestra es una muestra biológica, en algunos aspectos, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse en un tratamiento personalizado. Por ejemplo, se puede recolectar una muestra biológica de un sujeto individual que necesita un tratamiento para una afección. Usando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento, se puede generar un perfil de expresión de moléculas diana asociadas con la condición del sujeto para identificar uno o más objetivos terapéuticos para el sujeto, identificando así un régimen de tratamiento para el sujeto. En consecuencia, los métodos para identificar un régimen de tratamiento para un sujeto individual también se describen en el presente documento. En este aspecto, el método comprende: (i) contactar una muestra derivada de un sujeto que necesita un tratamiento para una afección, con una composición que comprende una pluralidad de sondas diana que se unen a las moléculas diana asociadas con la condición; (ii) liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana unidas; (iii) detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, en donde las señales son distinguibles para las secuencias de nucleótidos de identificación, identificando así las moléculas de unión a dianas correspondientes y determinando la presencia de una o más moléculas diana en la muestra; y (iv) generar un perfil de expresión de las moléculas diana detectadas por las sondas diana, seleccionando así un régimen de tratamiento para el sujeto individual basado en el perfil de expresión. Los métodos se pueden aplicar a cualquier condición descrita en la sección posterior. En algunas realizaciones, la condición es cáncer. En algunas

realizaciones, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas no se detectan por métodos basados en electroforesis en gel.

En algunos aspectos, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento se pueden usar para evaluar cómo la dosificación del fármaco corresponde a la farmacodinámica celular y, por lo tanto, se usa para controlar la respuesta de un sujeto a un tratamiento para su afección. Por ejemplo, se pueden recolectar muestras biológicas del sujeto antes y/o durante el curso del tratamiento. Usando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento, se pueden generar perfiles de expresión de moléculas diana asociadas con la condición del sujeto antes y/o durante el curso del tratamiento para comparar y determinar cualquier cambio en los niveles de expresión de las moléculas diana en el sujeto, monitorizando así la respuesta al tratamiento en el sujeto. Por consiguiente, se describe en este documento un método para controlar un tratamiento para una afección en un sujeto. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra derivada de un sujeto después de un tratamiento para una afección, con una composición que comprende una pluralidad de sondas diana que se unen a moléculas diana asociadas con la afección; (ii) liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana unidas; (iii) detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, en donde las señales son distinguibles para las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, identificando así las correspondientes moléculas de unión a la diana y determinando la presencia de una o más moléculas diana en la muestra; (iv) generar un perfil de expresión de las moléculas diana detectadas por las sondas diana; (v) comparar el perfil de expresión con un perfil de expresión generado a partir de una muestra derivada del mismo sujeto antes del tratamiento o después del tratamiento en un punto temporal anterior; y (vi) determinar los cambios en los niveles de expresión de las moléculas diana, monitorizando así el tratamiento para la condición en el sujeto. En algunas realizaciones, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas no se detectan por métodos basados en electroforesis en gel.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además administrar un tratamiento alternativo para la afección, cuando no hay cambios sustanciales en los niveles de expresión de las moléculas diana o los cambios en los niveles de expresión de las moléculas diana no representan una reducción en los síntomas asociado con la condición.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además continuar el mismo tratamiento para la afección, cuando los cambios en los niveles de expresión de las moléculas diana representan una reducción en los síntomas asociados con la afección.

En algunos aspectos, los métodos, sistemas y kits descritos en este documento pueden usarse para diagnosticar una afección en un sujeto. Por ejemplo, se puede recolectar una muestra biológica de un sujeto que está en riesgo de sufrir una afección. Usando los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento, se puede generar un perfil de expresión de moléculas diana asociadas con la afección por diagnosticar para comparar con uno o más perfiles de expresión de referencia (por ejemplo, correspondiente a un sujeto sano normal y/o un sujeto que tiene la condición a ser diagnosticada), determinando así si el sujeto está en riesgo de la condición. En consecuencia, aquí se describe también un método para diagnosticar una afección en un sujeto. El método comprende: (i) poner en contacto una muestra derivada de un sujeto que está en riesgo de sufrir una afección, con una composición que comprende una pluralidad de sondas diana que se unen a moléculas diana asociadas con la afección; (ii) liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de las sondas diana unidas; (iii) detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas, en donde las señales son distinguibles para las secuencias de nucleótidos de identificación, identificando así las moléculas de unión a dianas correspondientes y determinando la presencia de una o más moléculas diana en la muestra; (iv) generar un perfil de expresión de las moléculas diana detectadas por las sondas diana; (v) comparar el perfil de expresión con al menos un perfil de expresión de referencia, determinando así si el sujeto está en riesgo de la afección. En algunas realizaciones, las señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas no se detectan por métodos basados en electroforesis en gel.

En algunas realizaciones, un perfil de expresión de referencia está asociado con la condición. En algunas realizaciones, un perfil de expresión de referencia está asociado con un sujeto sano normal.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar la heterogeneidad intratumoral, que puede usarse como un biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico.

Afecciones (por ejemplo, enfermedades o trastornos) susceptibles de diagnóstico, pronóstico/monitorización y/o tratamiento utilizando métodos, sistemas, kits o diversos aspectos descritos en este documento.

Se pueden usar diferentes realizaciones de los métodos, sistemas y/o kits descritos en este documento para el diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto, por ejemplo, una afección que afecta a cierto tejido en un sujeto. Por ejemplo, la enfermedad o trastorno en un sujeto puede asociarse con mama, páncreas, sangre, próstata, colon, pulmón, piel, cerebro, ovario, riñón, cavidad oral, garganta, líquido cefalorraquídeo, hígado u otros tejidos, y cualquier otra combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquier aspecto descrito en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno de mama. La enfermedad o trastorno mamario de ejemplo incluye cáncer de mama.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno pancreático. Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos pancreáticos incluyen pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, pancreatitis hereditaria, cáncer pancreático (por ejemplo, tumores endocrinos o exocrinos), etc., y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquier aspecto descrito en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno de la sangre. Ejemplos de enfermedades o trastornos de la sangre incluyen, entre otros, trastornos plaquetarios, enfermedades de von Willebrand, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, anemia falciforme, talasemia, anemia, anemia aplásica, anemia de Fanconi, hemocromatosis, anemia hemolítica, hemofilia, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia ferropénica, anemia perniciosa, policitemia vera, trombocitemia y trombocitosis, trombocitopenia y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno de la próstata. Ejemplos no limitantes de una enfermedad o trastorno de la próstata pueden incluir próstata, hiperplasia prostática, cáncer de próstata y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno del colon. Ejemplos de enfermedades o trastornos del colon pueden incluir, entre otros, cáncer colorrectal, pólipos de colon, colitis ulcerosa, diverticulitis y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquier aspecto descrito en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno pulmonar. Ejemplos de enfermedades o trastornos pulmonares pueden incluir, entre otros, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infecciones, por ejemplo, gripe, neumonía y tuberculosis, y cáncer de pulmón.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno de la piel, o una afección de la piel. Una enfermedad o trastorno cutáneo de ejemplo puede incluir cáncer de piel.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno cerebral o mental (o enfermedad o trastorno neural). Ejemplos de enfermedades o trastornos cerebrales (o enfermedad o trastorno neural) pueden incluir, entre otros, infecciones cerebrales (por ejemplo, meningitis, encefalitis, absceso cerebral), tumor cerebral, glioblastoma, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, esclerosis múltiple (EM), vasculitis y trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia y enfermedad de Alzheimer), síndrome de Timothy, síndrome de Rett, X frágil, autismo, esquizofrenia, atrofia muscular espinal, demencia frontotemporal, cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento puede incluir una enfermedad o trastorno hepático. Ejemplos de enfermedades o trastornos hepáticos pueden incluir, entre otros, hepatitis, cirrosis, cáncer de hígado, cirrosis biliar, hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Budd-Chiari, hemocromatosis, relacionada con la transtiretina amiloidosis hereditaria, síndrome de Gilbert y cualquier combinación de los mismos.

En otras realizaciones, la afección (por ejemplo, enfermedad o trastorno) susceptible de diagnóstico y/o tratamiento usando cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento puede incluir cáncer. Un "cáncer" o "tumor" como se usa en el presente documento se refiere a un crecimiento incontrolado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales. Un sujeto que tiene un cáncer o un tumor es un sujeto que tiene células cancerosas objetivamente medibles presentes en el cuerpo del sujeto. En esta definición se incluyen cánceres benignos y malignos, así como tumores latentes o micrometástasis. Los cánceres que migran desde su ubicación original y siembran órganos vitales pueden conducir a la muerte del sujeto a través del deterioro funcional de los órganos afectados. Los cánceres hemopoyéticos, como la leucemia, pueden superar a los compartimentos hemopoyéticos normales en un sujeto, lo que conduce a una falla hemopoyética (en forma de anemia, trombocitopenia y neutropenia) que finalmente causa la muerte.

Por "metástasis" se entiende la propagación del cáncer desde su sitio primario a otros lugares del cuerpo. Las células cancerosas pueden separarse de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (metástasis) en tejidos normales en otras partes del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, que depende de que las células tumorales se desprendan del tumor primario, viajen a través del torrente sanguíneo y se detengan en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro de sangre y pueden crecer para formar una masa

potencialmente mortal. Las vías moleculares estimulantes e inhibitorias dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento, y las interacciones entre la célula tumoral y las células huésped en el sitio distante también son significativas.

- 5 Las metástasis se detectan con mayor frecuencia mediante el uso exclusivo o combinado de exploraciones de resonancia magnética (MRI), exploraciones de tomografía computarizada (CT), recuentos de sangre y plaquetas, estudios de función hepática, radiografías de tórax y exploraciones óseas además de monitorización de síntomas específicos.

Ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar; 10 cáncer de vejiga; cáncer de hueso; cáncer de cerebro y SNC; cáncer de mama; cáncer del peritoneo; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon y recto; cáncer de tejido conectivo; cáncer del sistema digestivo; cáncer endometrial; cáncer de esófago; cáncer de ojo; cáncer de cabeza y cuello; cáncer gástrico (incluido el cáncer gastrointestinal); glioblastoma; carcinoma hepático; hepatoma neoplasia intraepitelial; cáncer de riñón o renal; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer 15 de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón); linfoma incluyendo linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; melanoma; mieloma neuroblastoma; cáncer de cavidad oral (por ejemplo, labio, lengua, boca y faringe); cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer de recto; cáncer del sistema respiratorio; carcinoma de glándulas salivales; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de células escamosas; cáncer de estómago; cáncer testicular; cáncer de tiroides; cáncer uterino o 20 endometrial; cáncer del sistema urinario; cáncer de vulva así como otros carcinomas y sarcomas; así como el linfoma de células B (incluido el linfoma no Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (CLL); 25 leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y el trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (como el asociado con tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

En algunas realizaciones, los métodos y sistemas descritos en el presente documento se pueden usar para determinar 30 en un sujeto una etapa dada de cáncer, por ejemplo, con base en el perfil de expresión generado usando los métodos descritos en el presente documento. La etapa de un cáncer generalmente describe el grado en que el cáncer ha progresado y/o se ha extendido. La etapa generalmente toma en cuenta el tamaño de un tumor, qué tan profundamente ha penetrado el tumor, si el tumor ha invadido los órganos adyacentes, cuántos ganglios linfáticos se ha metastatizado (si corresponde) y si el tumor se ha diseminado a órganos distantes. La estadificación del cáncer generalmente se usa 35 para evaluar el pronóstico del cáncer como predictor de supervivencia, y el tratamiento del cáncer se determina principalmente por la estadificación.

Muestra

De acuerdo con diversas realizaciones descritas en el presente documento, una muestra, que incluye cualquier fluido o muestra (procesada o no procesada) u otra muestra biológica, puede someterse a los métodos de diversos aspectos descritos en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, la muestra puede incluir un fluido biológico obtenido de un sujeto. Los fluidos biológicos de ejemplo obtenidos de un sujeto pueden incluir, entre otros, sangre (incluida sangre completa, plasma, sangre de cordón umbilical y suero), productos de lactancia (por ejemplo, leche), líquidos amnióticos (por ejemplo, una muestra recolectada durante la amniocentesis), esputo, saliva, orina, líquido peritoneal, líquido pleural, semen, líquido cefalorraquídeo, aspirado bronquial, transpiración, moco, heces licuadas o muestras de heces, líquido sinovial, líquido 45 linfático, lágrimas, aspirado traqueal y fracciones de los mismos. En algunas realizaciones, un fluido biológico puede incluir un homogeneizado de una muestra de tejido (por ejemplo, biopsia) de un sujeto. En una realización, una muestra de prueba puede comprender una suspensión obtenida de la homogeneización de una muestra sólida obtenida de un órgano sólido o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, se puede obtener una muestra de un hisopo de la mucosa. En algunas realizaciones, se puede obtener una muestra de una biopsia de tejido (por ejemplo, pero sin 50 limitarse a una biopsia de piel). En algunas realizaciones, una muestra puede ser un aspirado con aguja fina.

En algunas realizaciones, se puede obtener una muestra de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, la muestra se puede obtener de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer, o que se sospecha que tiene un riesgo de desarrollar cáncer.

55 En algunas realizaciones, se puede obtener una muestra de un sujeto que está siendo tratado por una enfermedad o trastorno. En otras realizaciones, la muestra puede obtenerse de un sujeto cuya enfermedad o trastorno previamente tratado está en remisión. En otras realizaciones, la muestra de prueba se puede obtener de un sujeto que tiene una recurrencia de una enfermedad o trastorno previamente tratado. Por ejemplo, en el caso de cáncer como el cáncer de seno, se puede obtener una muestra de prueba de un sujeto que está recibiendo un tratamiento contra el cáncer, o cuyo cáncer fue tratado y está en remisión, o que tiene recurrencia del cáncer.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" puede significar un humano o un animal. Ejemplos de sujetos incluyen primates (por ejemplo, humanos y monos). Por lo general, el animal es un vertebrado, como un primate, un roedor, un animal doméstico o un animal de caza. Los primates incluyen chimpancés, monos cinomolgus, monos araña y macacos, por ejemplo, Rhesus. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsteres. Los animales domésticos y de caza incluyen vacas, caballos, cerdos, ciervos, bisontes, búfalos, especies felinas, por ejemplo, gatos domésticos, especies caninas, por ejemplo, especies de perros, zorros, lobos y aves, por ejemplo, pollo, emú, avestruz. Un paciente o un sujeto incluye cualquier subconjunto de lo anterior, por ejemplo, todo lo anterior, o incluye uno o más grupos o especies tales como humanos, primates o roedores. En ciertas realizaciones de los aspectos descritos aquí, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un humano. Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en este documento. Un sujeto puede ser hombre o mujer. El término "paciente" y "sujeto" no denota una edad particular. Por lo tanto, cualquier sujeto de mamíferos, desde adultos hasta recién nacidos, así como también fetos, están cubiertos.

En una realización, el sujeto o paciente es un mamífero. El mamífero puede ser un humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca, pero no se limita a estos ejemplos. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto puede ser un animal y/o mascota domesticado.

En algunas realizaciones, una muestra que puede analizarse mediante los métodos, sistemas y kits descritos en el presente documento puede obtenerse de una fuente ambiental. Ejemplos de una fuente ambiental incluyen, entre otros, agua, suelo, productos alimenticios, estanques, depósitos y cualquier combinación de los mismos.

Enlazadores

Como se usa en el presente documento, el término "enlazador" generalmente se refiere a una entidad molecular que puede conectarse directa o indirectamente en dos partes de una composición. Por ejemplo, en algunas realizaciones con respecto a una sonda informadora, el enlazador conecta directa o indirectamente una primera región específica de sonda diana a una etiqueta detectable descrita aquí. En algunas realizaciones con respecto a una sonda de captura, el enlazador conecta directa o indirectamente una segunda región específica de la sonda diana a una etiqueta de afinidad descrita aquí. En algunas realizaciones con respecto a una sonda diana, el enlazador conecta directa o indirectamente una secuencia de nucleótidos de identificación a una molécula de unión a diana. En algunas realizaciones con respecto a una sonda de control, el enlazador conecta directa o indirectamente una secuencia de control de identificación a una molécula de unión de control.

En algunas realizaciones, un enlazador puede comprender un péptido o enlazador de ácidos nucleicos. El péptido o enlazador de ácidos nucleicos puede configurarse para tener una secuencia que comprende al menos uno de los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina (Gly), serina (Ser), asparagina (Asn), treonina (Thr), metionina (Met) o alanina (Ala), o al menos una de las secuencias de codones que codifican los aminoácidos antes mencionados (es decir, Gly, Ser, Asn, Thr, Met o Ala). Tales aminoácidos y las secuencias de ácido nucleico correspondientes se usan generalmente para proporcionar flexibilidad a un enlazador. Sin embargo, en algunas realizaciones, otros aminoácidos polares no cargados (por ejemplo, Gln, Cys o Tyr), aminoácidos no polares (por ejemplo, Val, Leu, Ile, Pro, Phe y Trp) o secuencias de ácido nucleico que codifican los aminoácidos de los mismos también se puede incluir en una secuencia de enlace. En realizaciones alternativas, se pueden agregar aminoácidos polares o secuencias de ácido nucleico de los mismos para modular la flexibilidad de un enlazador. Un experto en la materia puede controlar la flexibilidad de un enlazador variando los tipos y números de residuos en el enlazador. Véase, por ejemplo, Perham, 30 Biochem. 8501 (1991); Wriggers et al., 80 Biopolymers 736 (2005).

En realizaciones alternativas, un enlazador puede comprender un enlazador químico de cualquier longitud. En algunas realizaciones, los enlazadores químicos pueden comprender un enlace directo o un átomo como oxígeno o azufre, una unidad como NH, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH o una cadena de átomos, como como alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquino sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalqueno, arilalquino, heteroarilalquilo, heteroarilalqueno, heteroarilalquino, heterociclilalquilo, heterociclilalqueno, heterociclilalquino, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilarilalquilo, alquilarilalqueno

alquilarilalquino, alquenilarilalquilo, alquenilarilalqueno, alquenilarilalquino, alquinarilalquilo, alquinarilalqueno, alquinarilalquino, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalqueno, alquilheteroarilalquino, alquinheteroarilalquilo, alquinheteroarilalqueno, alquinheteroarilalquino, alquinheteroarilalquilo,

alquinheteroarilalqueno, alquinheteroarilalquino, alquilheterociclilalquilo,

alquilheterociclilalqueno, alquilheterociclilalquino, alquinheterociclilalquilo,

alquinheterociclilalqueno, alquinheterociclilalquino, alquinheterociclilalquilo, alquinheterociclilalqueno, alquinheterociclilalquino, alquilarilo, alquenilarilo, alquinarilo, alquilheteroarilo, alquinheteroarilo, alquinheteroarilo, donde uno o más metilenos pueden ser interrumpidos o terminados por O, S, S(O), SO₂, NH, C(O)N(R¹)₂, enlazador escindible, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocíclico sustituido o no sustituido; donde R¹ es hidrógeno, acilo, alifático o alifático sustituido. En algunas realizaciones, el enlazador químico puede ser una cadena polimérica (ramificada o lineal).

En algunas realizaciones, el enlazador químico puede comprender un enlace o agente de conjugación estable o lábil (por ejemplo, escindible). Las conjugaciones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, enlace covalente, enlace amida, adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono, cicloadición de Huisgen azida-alquino, reacción de Diels-Alder, enlace disulfuro, enlace éster, adiciones de Michael, enlace silano, uretano, anillo nucleófilo reacciones de apertura: epóxidos, química de carbonilo no aldol, reacciones de cicloadición: cicloadición 1,3-dipolar, sensible a la temperatura, radiación (IR, IR cercano, UV) o agente de conjugación sensible, enlace sensible al pH o agente de conjugación, enlaces no covalentes (por ejemplo, formación de complejos de carga iónica, enlaces de hidrógeno, interacciones pi-pi, interacción ciclodextrina/huésped anfitrión) y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "agente de conjugación" significa una unidad estructural orgánico que conecta dos partes de un compuesto. Sin limitaciones, cualquier química de conjugación conocida en la técnica para conjugar dos moléculas o diferentes partes de una composición juntas puede usarse para acoplar dos partes de un compuesto. Las moléculas de acoplamiento y/o grupos funcionales de ejemplo para el acoplamiento de dos partes de un compuesto incluyen, pero no se limitan a, un polietilenglicol (PEG, NH₂-PEGX-COOH que puede tener un brazo espaciador de PEG de varias longitudes X, donde $1 < X < 100$, por ejemplo, PEG-2K, PEG-5K, PEG-10K, PEG-12K, PEG-15K, PEG-20K, PEG-40K y similares), agente de conjugación de maleimida, PASilación, HESilación, Bis(sulfosuccinimidilo) agente de conjugación suberato, agente de conjugación de ADN, agente de conjugación de péptidos, agente de conjugación de silano, agente de conjugación hidrolizable y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el enlazador incluye un par de moléculas de acoplamiento. Los términos "par de moléculas de acoplamiento" y "par de acoplamiento", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a la primera y segunda moléculas que se unen específicamente entre sí. Un miembro del par de acoplamiento se conjuga con una primera entidad, mientras que el segundo miembro se conjuga con una segunda entidad, que se desea conectar a la primera entidad. Solo a modo de ejemplo, la primera entidad puede ser una etiqueta detectable de una sonda informadora descrita en el presente documento, y la segunda entidad puede ser una primera región específica de la sonda diana de la sonda informadora. Por lo tanto, el marcador detectable se puede acoplar a la primera región específica de la sonda diana mediante un par de moléculas de acoplamiento. Como otro ejemplo, una superficie de sustrato sólido puede comprender un primer miembro del par de acoplamiento, mientras que una etiqueta de afinidad de una sonda de captura descrita aquí puede comprender un segundo miembro del par de acoplamiento. Como se usa en el presente documento, la frase "primera y segunda moléculas que se unen específicamente entre sí" se refiere a la unión del primer miembro del par de acoplamiento al segundo miembro del par de acoplamiento con mayor afinidad y especificidad que a otras moléculas.

Ejemplos de pares de moléculas de acoplamiento incluyen, sin limitaciones, cualquier compuesto hapteno o antigénico en combinación con un anticuerpo o porción de unión correspondiente o fragmento del mismo (por ejemplo, digoxigenina y anti-digoxigenina; inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina antirratón de cabra) y pares de unión no inmunológica (por ejemplo, biotina-avidina, biotina-estreptavidina), hormona (por ejemplo, proteína de unión a tiroxina y hormona cortisol), agonista receptor-receptor, antagonista receptor-receptor (por ejemplo, receptor de acetilcolina-acetilcolina o un análogo de la misma), proteína A IgG, lectina-carbohidrato, cofactor enzima-enzima, inhibidor enzima-enzima y pares de oligonucleótidos complementarios capaces de formar dúplex de ácido nucleico). El par de moléculas de acoplamiento también puede incluir una primera molécula con carga negativa y una segunda molécula con carga positiva.

Un ejemplo de uso de conjugación de pares de acoplamiento es la conjugación biotina-avidina o biotina-estreptavidina. En este enfoque, una primera entidad está biotinilada (es decir, la primera entidad comprende una molécula de biotina) y una segunda entidad que se desea conectar a la primera entidad puede comprender una avidina o estreptavidina. Muchos kits comerciales también están disponibles para moléculas de biotinilación, como las proteínas. Por ejemplo, una aminooxi-biotina (AOB) puede usarse para unir covalentemente biotina a una molécula con un grupo aldehído o cetona.

Todavía otro ejemplo del uso de la conjugación de pares de acoplamiento es la conjugación de ácidos nucleicos bicatenarios. En este enfoque, una primera entidad puede comprender una primera cadena del ácido nucleico bicatenario y una segunda entidad que se desea conectar a la primera entidad puede comprender una segunda cadena del ácido nucleico bicatenario. 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 del esqueleto, puntos de ramificación y residuos no nucleotídicos, grupos o puentes.

En algunas realizaciones, un enlazador puede ser un sustrato físico, por ejemplo, micropartículas o partículas magnéticas.

Los enlazadores pueden ser de cualquier forma. En algunas realizaciones, los enlazadores pueden ser lineales. En algunas realizaciones, los enlazadores se pueden plegar. En algunas realizaciones, los enlazadores pueden estar ramificados. En otras realizaciones, el enlazador adopta la forma del sustrato físico.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender un enlazador escindible descrito aquí.

Algunas definiciones seleccionadas

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos aquí y como tales pueden variar. La terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Como se usa en este documento y en las reivindicaciones, las formas singulares incluyen la referencia plural y viceversa a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "o" es inclusivo a menos que se modifique, por ejemplo, por "cualquiera". Aparte de en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizadas en este documento deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" con respecto a los valores numéricos significa dentro del 5%.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende(s)" se usa en referencia a composiciones, métodos y sus respectivos componentes, que son esenciales para la invención, pero abiertos a la inclusión de datos no especificados elementos, sean esenciales o no.

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

Como se usa en el presente documento, el término "que consiste en" o "consiste(s) en" 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.

El término "detección multiplexada" se refiere a la detección de una pluralidad de moléculas diana de una sola muestra en un único ensayo. En algunas realizaciones, la detección multiplexada se refiere a mediciones simultáneas de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, 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, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500 o más diferentes moléculas diana de una sola muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra fijada de células o tejidos" se refiere a una muestra obtenida de una célula o tejido que se ha fijado previamente en una solución de fijación de células o tejidos y, opcionalmente, luego se ha incorporado en un sustrato sólido. Se conocen diversas soluciones de fijación de células o tejidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a aldehídos (por ejemplo, pero sin limitarse a formaldehído, formalina), alcoholes (por ejemplo, pero no se limitan a, etanol, metanol y/o acetona), agentes oxidantes (por ejemplo, entre otros, tetraóxido de osmio, dicromato de potasio, ácido crómico y/o permanganato de potasio), picratos, mercurial (por ejemplo, entre otros, B-5 y/o fijador de Zenker), fijador de efecto de protección de solvente orgánico mediado por regulador Hepes-ácido glutámico (HOPE). En algunas realizaciones, una muestra fijada de células o tejidos también abarca una muestra congelada de células o tejidos.

Como se usa en el presente documento, el término "código de barras de ADN extraño o foráneo" se refiere a una secuencia de ADN utilizada como código de barras o etiqueta para la identificación de una molécula diana en una muestra de un organismo, en donde la secuencia de ADN es una secuencia extraña o foránea relativo a los genomas del organismo del cual se deriva u obtiene la muestra. Como se usa en el presente documento, el término "extraño o foráneo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que muestra poca o ninguna homología contra un organismo (del que se deriva u obtiene una muestra) y/u otros organismos principales, por ejemplo, en la secuencia de referencia de NCBI (RefSeq) base de datos. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos es extraña o foránea cuando comparte una homología (identidad de secuencia) con la del organismo en no más del 50% o menos, incluyendo, por ejemplo, no más del 40%, no más del 30%, no más del 20%, no más del 10% o menos. En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos de identificación descritas aquí son códigos de barras de ADN extraños o foráneos.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo de longitud completa o moléculas de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o una porción de proteína del mismo que comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye un antígeno sitio de unión del anticuerpo intacto y, por lo tanto, conserva la capacidad de unirse a una diana, como un epítipo o antígeno. Ejemplos de porciones de anticuerpos o proteínas de unión al epítipo abarcadas por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CHI; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CHI; (iii) el fragmento Fd que tiene dominios VH y CHI; (iv) el fragmento Fd' que tiene dominios VH y CHI y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CHI; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward et al., 341 Nature 544 (1989)) que consiste en un dominio VH o un dominio VL que se une al antígeno; (vii) regiones CDR aisladas o regiones CDR aisladas presentadas en un marco funcional; (viii) fragmentos F(ab')₂ que son fragmentos bivalentes que incluyen dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpos de cadena

sencilla (por ejemplo, cadena simple Fv; scFv) (Bird et al., 242 Science 423 (1988); y Huston et al., 85 PNAS 5879 (1988)); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptidos (véase, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger et al., 90 PNAS 6444 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena liviana complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., 8 Protein Eng. 1057 (1995) y la Patente de los Estados Unidos No. 5,641,870).

Los "anticuerpos" incluyen porciones de anticuerpos que se unen a antígenos tales como péptidos de epítipo o de unión a antígeno, paratopos, CDR funcionales; anticuerpos recombinantes; anticuerpos quiméricos; tricuerpos; midicuerpos; o derivados de unión a antígeno, análogos, variantes, porciones o fragmentos de los mismos.

El término "aptámero" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de unirse a una molécula diana, tal como un polipéptido. Por ejemplo, un aptámero de la invención puede unirse específicamente a una molécula diana, o a una molécula en una ruta de señalización que modula la expresión y/o actividad de una molécula diana. La generación y el uso terapéutico de aptámeros están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,475,096.

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas tienen el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que podrían usarse en conexión con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención previa o por cualquier otro motivo. Todas las declaraciones sobre la fecha o la representación del contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que los comúnmente entendidos por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método, dispositivo y material conocido puede usarse en la práctica o prueba de la invención, se describen en este documento los métodos, dispositivos y materiales a este respecto.

Ejemplos

Ejemplo 1. Optimización de métodos para la detección multiplex de moléculas diana de una muestra

Evaluación de diferentes enlazadores escindibles: En diversas realizaciones descritas en el presente documento, las moléculas de unión a dianas pueden conjugarse con secuencias de nucleótidos de identificación a través de cualquier enlazador(es) divisible(s) conocido en la técnica. En este ejemplo, se evaluaron tres métodos alternativos para conjugar moléculas diana (por ejemplo, anticuerpos) con secuencias de nucleótidos de identificación (por ejemplo, ADN) a través de un enlazador escindible utilizando procedimientos de ejemplo que se detallan a continuación.

En el primer método, las moléculas de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpos) se modificaron con carbonato de (E)-ciclooct-4-enil 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (N-hidroxi-succinimidilo de trans-cicloocteno éster; TCO-NHS) y sintetizado como se informó anteriormente en la Ref. 26. Si está presente, la azida de sodio se eliminó usando una columna de desalación Zeba de 2 ml (7 K MWCO). La reacción se realizó usando 1000 equivalentes molares de TCO-NHS en PBS que contenía DMF al 10% (v/v) y bicarbonato de sodio 10 mM durante 4 h a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se hizo reaccionar un Tz-NHS fotoescindible con un grupo amina en el extremo 5' de la cadena de ADN 70-mero (exceso 15 molar) durante 4 h a temperatura ambiente. Después de que las reacciones concluyeron, el conjugado de molécula de unión a la diana-TCO (por ejemplo, Ab-TCO) se purificó usando una columna Zeba (7000 MWCO), y el conjugado de ADN-Tz se purificó usando un filtro Amicon 3 K MWCO seguido de tres lavados con PBS. A continuación, la molécula de unión a la diana-TCO (por ejemplo, Ab-TCO) y Tz-DNA se combinaron mediante química de clic (26) durante dos horas a temperatura ambiente. La sonda diana final (por ejemplo, conjugado de anticuerpo-ADN) se purificó por separación de tamaño usando filtros Amicon 100 K MWCO seguidos de lavados con PBS.

En el segundo método, el enlazador bifuncional fotoescindible (Figura 2) reaccionó (exceso de 10 molares) con el grupo amina en el extremo 5' del ADN monocatenario (IDT) 70-mero durante 4 h a temperatura ambiente. Tres horas después de que comenzara la reacción de ADN, las moléculas de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) se hicieron reaccionar con 2-iminotiolano (reactivo de Traut, 10 exceso molar, Thermo Scientific) para convertir grupos amina en grupos sulfhidrilo (-SH) en PBS con 2 EDTA mM durante 1 hora a temperatura ambiente. Cuando concluyeron las reacciones, las moléculas de unión a diana tioladas (por ejemplo, anticuerpo) se separaron del Reactivo de Traut en exceso usando una columna de desalación Zeba (7000 MWCO) que se había equilibrado con PBS que contenía EDTA 2 mM. El exceso de enlazador bifuncional fotoescindible (PC) se purificó del ADN con un filtro Amicon 3 K MWCO. Luego, la molécula SH que se une a la diana (por ejemplo, el anticuerpo SH) y el enlazador de ADN-PC (exceso ~15 molar) se hicieron reaccionar durante la noche a 4°C. La sonda diana final (por ejemplo, conjugado anticuerpo-ADN) se purificó por separación de tamaño usando filtros Amicon 100 K MWCO seguidos de lavados con PBS.

En el tercer método, se hizo reaccionar un enlazador de amina a sulfhidrilo, 6-[3'(2-piridilditio)-propionamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SPDP, Thermo Scientific), con una molécula de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) en PBS-EDTA con un exceso de 50 molares y envejecido durante 1 hora a temperatura ambiente. Al final de la reacción, se eliminó el exceso de sulfo-LC-SPDP usando una columna de desalación Zeba (7000 MWCO). El ADN tiolizado se redujo con DTT y se purificó a través de una columna NAP-5, como se describió anteriormente en la conjugación ADN-anticuerpo en la sección "Materiales y métodos de ejemplo" a continuación. Una vez que se purificó el exceso de sulfo-LC-SPDP usando una columna Zeba, la molécula de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) se hizo reaccionar con el ADN tiolizado reducido (exceso de ~15 molar) durante la noche a 4°C. La sonda diana final (por ejemplo, conjugado anticuerpo-ADN) se purificó por separación de tamaño usando filtros Amicon 100 K MWCO seguidos de lavados con PBS.

Los tres métodos de enlace molécula-ADN de unión a diana escindible por UV (por ejemplo, Ab-ADN) se compararon marcando primero las células A431 con conjugados de ADN EGFR y EPCAM y luego determinando qué método produjo la relación señal/ruido más alto SNR), por ejemplo, a través de Nanostring. La conjugación de moléculas diana (por ejemplo, anticuerpos) con el enlazador fotoescindible bifuncional descrito en la figura 2A dio la SNR más alta. Esta sonda diana (por ejemplo, conjugado de anticuerpo) se comparó luego con la sonda diana (por ejemplo, conjugado anticuerpo-ADN que contiene el enlace disulfuro escindible DTT. Las células SKOV3 (5×10^5 células) se marcaron con conjugados Herceptina-ADN (1 µg). Después de 30 minutos, las células se centrifugaron a $400 \times g$ durante 3 minutos, y el exceso de Herceptina se eliminó con dos lavados con SB+. El conjugado Herceptina-ADN con el enlazador disulfuro se escindió agregando DTT (50 mM) durante 15 minutos a 37°C. Al mismo tiempo, el conjugado Herceptina-ADN con el enlazador fotoescindible se expuso a la luz UV (longitud de onda) durante 15 minutos. Después de la etapa de escisión de 15 minutos, las células se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante. El ADN en el sobrenadante se midió usando el ensayo de Qubit monocatenario para determinar la cantidad de ADN escindido del anticuerpo. El enlazador fotoescindible UV tenía 2.4 veces más ADN que el enlazador disulfuro.

Optimización de las condiciones de lisis: Se evaluaron cuatro condiciones de lisis diferentes para determinar cuál era la más eficiente (Figura 3): (A) Proteinasa K con regulador PKD (Qiagen) y UV; (B) Proteinasa K con regulador ATL (Qiagen) y UV; (C) regulador ATL con UV; y (D) UV. Según los métodos probados, el método (B) mostró un aumento del 20% en la señal sobre los métodos (A) y (C).

Ejemplo 2. Desarrollo y validación de métodos para la detección multiplex de moléculas diana de una muestra.

En este ejemplo, un código de barras de anticuerpos con plataforma de ADN fotoescindible (ABCD) se diseñó para realizar mediciones de proteínas multiplexadas y perfiles de todo el sistema en pequeñas cantidades de material de muestra clínica (por ejemplo, ~100 células). El método fue diseñado para preservar el material genético y permitir el aislamiento específico de células individuales raras. Este enfoque interroga a las células individuales marcando anticuerpos de interés con "códigos de barras" de ADN cortos (~70-mer) -con cada anticuerpo que tiene una secuencia única- usando un enlazador fotoescindible estable. Los enlazadores fotoescindibles conocidos en la técnica (por ejemplo, Ref. 9) se pueden usar aquí. Después de que el anticuerpo se une a las células, el enlazador fotoescindible libera el código de barras de ADN único, que luego puede detectarse por varios medios. En algunas realizaciones, se pueden identificar diferentes códigos de barras de ADN en función del tamaño usando electroforesis en gel. Sin embargo, este método tenía multiplexación limitada (8 a 12 marcadores) y solo era semicuantitativo (9). Otros métodos cuantitativos, como la secuenciación y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), son confiables y se pueden usar para detectar los códigos de barras de ADN liberados, pero pueden introducir sesgos durante los pasos de amplificación, requieren un tiempo de procesamiento prolongado o no son rentables. El qPCR multiplexado solo mide un máximo de cinco marcadores a la vez. Por lo tanto, se seleccionó una tecnología de hibridación de fluorescencia, que se ha utilizado tradicionalmente para la cuantificación multiplexada (16.384 códigos de barras) de cantidades femtomolares de ADN y ARN (10, 11), para detectar los códigos de barras de ADN liberados. Si bien la tecnología de hibridación de fluorescencia se ha utilizado para cuantificar el ADN y el ARN, no se había extendido previamente para medir proteínas dentro de las células o muestras clínicas. Este ejemplo y los ejemplos posteriores muestran la aplicación y validación de la plataforma ABCD en líneas celulares y muestras clínicas humanas, así como la evaluación de la respuesta al tratamiento farmacológico y la heterogeneidad inter e intrapaciente en el cáncer de pulmón.

Las células se cosecharon primero de aspirados con aguja fina (FNA) de un paciente dado (Figura 1A). Para aislar mejor las células cancerosas de su medio celular heterogéneo, los aspirados se marcaron con anticuerpos dirigidos contra marcadores establecidos (por ejemplo, CD45 para agotar los leucocitos infiltrantes de tumores de la muestra). El anticuerpo se marcó con nanopartículas magnéticas y se pasó a través de un dispositivo para microfluidos que contenía una capa magnética autoensamblada para agotar las células marcadas [12]. La población de células cancerosas purificadas se recuperó del dispositivo y se tiñó con una mezcla que comprende una pluralidad de una o más realizaciones de sondas diana como se describe en el presente documento. En este ejemplo, la población de células cancerosas purificadas se tiñó con una mezcla de sondas diana que contenían cada una un anticuerpo y un código de barras único unido mediante un enlazador fotoescindible (denominado "conjugado de anticuerpo" o "conjugado de anticuerpo-ADN" en este documento) (Figura 1B y Figura 2). Ejemplos de anticuerpos para usar en los conjugados de anticuerpos se enumeran en la Tabla 1 a continuación. En este ejemplo, se eligieron más de 90 anticuerpos en el cóctel y se usaron para demostrar que el marcado masivo produjo resultados similares al marcado

5

con un solo anticuerpo. Los 90 conjugados de anticuerpo-ADN fueron diseñados especialmente para marcar una secuencia de ADN foránea que no reaccionaría de forma cruzada con el genoma humano. Los marcadores diana se seleccionaron para cubrir las vías distintivas en el cáncer (por ejemplo, apoptosis, epigenética y daño en el ADN), los marcadores de diagnóstico de cáncer conocidos en la técnica, por ejemplo, los que se usan comúnmente en la clínica y las proteínas de limpieza y control. Antes del etiquetado, los conjugados de ADN-anticuerpo se aislaron mediante una supresión específica de inmunoglobulina G (IgG) y se agruparon en un cóctel. Después del bloqueo celular, la permeabilización y el marcado, y el lavado, el ADN se liberó de las células de interés tanto con escisión proteolítica como con fotoescisión para aumentar el rendimiento y, por extensión, la sensibilidad (Figura 1C).

Tabla 1: Lista de ejemplos de anticuerpos.

Anticuerpo	Especie	Catálogo	Proveedor
GAPDH (14C10)	Conejo	2118BF	Cell Signaling
β-Tubulina (9F3)	Conejo	2128BF	Cell Signaling
Ku80 (C48E7)	Conejo	2180BF	Cell Signaling
Fosfo-Chk2 (Thr68) (C13C1)	Conejo	2197BF	Cell Signaling
Proteína ribosómica S6 (54D2)	Ratón	2317BF	Cell Signaling
Fosfo-Chk1 (Ser345) (133D3)	Conejo	2348BF	Cell Signaling
VE-caderina (D87F2)	Conejo	2500BF	Cell Signaling
p53 (7F5)	Conejo	2527BF	Cell Signaling
Fosfo-53BP1 (Ser1778)	Conejo	2675BF	Cell Signaling
Fosfo-(Ser/Thr) ATM/ATR Substrato	Conejo	2851BF	Cell Signaling
Fosfo-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4)	Conejo	2855BF	Cell Signaling
Bim (C34C5)	Conejo	2933BF	Cell Signaling
Ciclina D3 (DCS22)	Ratón	2936BF	Cell Signaling
Ciclina D1 (92G2)	Conejo	2978BF	Cell Signaling
mTOR (7C10)	Conejo	2983BF	Cell Signaling
Fosfo-ciclina D1 (Thr286) (D29B3)	Conejo	3300BF	Cell Signaling
Fosfo-histona H3 (Ser10) (D2C8)	Conejo	3377BF	Cell Signaling
ALK (D5F3)	Conejo	3633BF	Cell Signaling
Fosfo-EGF Receptor (Tyr1068) (D7A5)	Conejo	3777BF	Cell Signaling
Fosfo-Akt (Ser473) (D9E)	Conejo	4060BF	Cell Signaling
Anticuerpo CDCP1	Conejo	4115BF	Cell Signaling
Ciclina E1 (HE12)	Ratón	4129BF	Cell Signaling
Fosfo-ciclina E1 (Thr62)	Conejo	4136BF	Cell Signaling
Fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	Conejo	4370BF	Cell Signaling
Keratina 7 (D1E4)	Conejo	4465BF	Cell Signaling
Histona H3 (D1H2)	Conejo	4499BF	Cell Signaling
Fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9)	Conejo	4511BF	Cell Signaling
Fosfo-SEK1/MKK4 (Ser257) (C36C11)	Conejo	4514BF	Cell Signaling
Pan-keratina (C11)	Ratón	4545BF	Cell Signaling
Keratina 8/18 (C51)	Ratón	4546BF	Cell Signaling

Anticuerpo	Especie	Catálogo	Proveedor
Keratina 18 (DC10)	Ratón	4548BF	Cell Signaling
Akt (pan) (C67E7)	Conejo	4691BF	Cell Signaling
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	Conejo	4695BF	Cell Signaling
COX IV (3E11)	Conejo	4850BF	Cell Signaling
Proteína ribosómica Fosfo-S6 (Ser235/236)	Conejo	4858BF	Cell Signaling
53BP1	Conejo	4937BF	Cell Signaling
β -Actina (13E5)	Conejo	4970BF	Cell Signaling
Akt2 (L79B2)	Ratón	5239BF	Cell Signaling
Fosfo-mTOR (Ser2448) (D9C2)	Conejo	5536BF	Cell Signaling
PARP escindido(Asp214) (D64E10)	Conejo	5625BF	Cell Signaling
Vimentina (D21H3)	Conejo	5741BF	Cell Signaling
Caspasa-9 escindida (Asp330) (D2D4)	Conejo	7237BF	Cell Signaling
Met (D1C2)	Conejo	8198BF	Cell Signaling
FGF receptor 4 (D3B12)	Conejo	8562BF	Cell Signaling
Axl (C89E7)	Conejo	8661BF	Cell Signaling
p38 MAPK (D13E1)	Conejo	8690BF	Cell Signaling
BRCA1 (D54A8)	Conejo	9025BF	Cell Signaling
Fosfo-Stat3 (Tyr705) (D3A7)	Conejo	9145BF	Cell Signaling
Caspasa-7 escindida (Asp198)	Conejo	9491BF	Cell Signaling
Caspasa-8 escindida (Asp391) (18C8)	Conejo	9496BF	Cell Signaling
Caspasa-9 escindida (Asp315)	Conejo	9505BF	Cell Signaling
PARP (46D11)	Conejo	9532BF	Cell Signaling
4E-BP1 (53H11)	Conejo	9644BF	Cell Signaling
Caspasa-3 escindida (Asp175)	Conejo	9661BF	Cell Signaling
Fosfo-histona H2A.X (Ser139) (20E3)	Conejo	9718BF	Cell Signaling
FGF receptor 1 (D8E4)	Conejo	9740BF	Cell Signaling
Caspasa-8 (1C12)	Ratón	9746BF	Cell Signaling
Caspasa-9	Conejo	9502 BF	Cell Signaling
Fosfo- β -Catenina (Ser675) (D2F1)	Conejo	4176BF	Cell Signaling
Fosfo-GSK-3 β (Ser9) (D85E12)	Conejo	5558BF	Cell Signaling
Dimetil-Histona H3 (Lys9) (D85B4)	Conejo	4658BF	Cell Signaling
Dimetil-Histona H3 (Lys4) (C64G9)	Conejo	9725BF	Cell Signaling
Dimetil-Histona H3 (Lys36) (C75H12)	Conejo	2901BF	Cell Signaling
Dimetil-Histona H3 (Lys27)	Conejo	9755BF	Cell Signaling
Dimetil-Histona H3 (Lys79)	Conejo	9757BF	Cell Signaling
Acetil-histona H3 (Lys9) (C5B11)	Conejo	9649BF	Cell Signaling
Acetil-histona H3 (Lys14)	Conejo	4318BF	Cell Signaling

Anticuerpo	Especie	Catálogo	Proveedor
Acetil-histona H3 (Lys27)	Conejo	4353BF	Cell Signaling
Acetil-histona H3 (Lys56)	Conejo	4243BF	Cell Signaling
Acetil-histona H3 (Lys18)	Conejo	9675BF	Cell Signaling
LC3A (D50G8)	Conejo	4599BF	Cell Signaling
LC3B (D11)	Conejo	3868BF	Cell Signaling
p21waf1/cip1	Conejo	2947BF	Cell Signaling
Beclina-1 (D40C5)	Conejo	3495BF	Cell Signaling
β-Catenina (6B3)	Conejo	9582BF	Cell Signaling
Babosa (C19G7)	Conejo	9585BF	Cell Signaling
Caracol (C15D3)	Conejo	3897BF	Cell Signaling
TCF8/ZEB1 (D80D3)	Conejo	3396BF	Cell Signaling
c-Myc (D84C12)	Conejo	5605BF	Cell Signaling
Met (D1C2)	Conejo	8198BF	Cell Signaling
Familia fosfo-Src (Tyr416)	Conejo	6943BF	Cell Signaling
Fosfo-Jak2 (Tyr1007)	Conejo	4406BF	Cell Signaling
Fosfo-Jak3 (Tyr980/981)	Conejo	5031BF	Cell Signaling
Fosfo-PLCγ1 (Tyr783)	Conejo	2821BF	Cell Signaling
Bcl-2 (D55G8)	Conejo	4223BF	Cell Signaling
Bcl-xL (54H6) mAb de conejo #2764	Conejo	2764BF	Cell Signaling
Control de ratón IgG1	Ratón	400102	Biolegend
Control de ratón IgG2a	Ratón	400202	Biolegend
Control de ratón IgG2b	Ratón	401202	Biolegend
Control de conejo	Conejo	550875	BD Bioscience
Control de rata IgG2b	Rata	553986	BD Bioscience
Her2	Humano/Ratón	Herceptina	Genentech
EGFR	Humano/Ratón	Cetuximab	Bristol- Meyers
EpCAM	Ratón	MAB9601	R&D
MUC1	Ratón	M01102909	Fitzgerald
MUC16	Ratón	ab1107	abcam
EpHA2	Ratón	MAB3035	R&D
FOLR1	Ratón	MAB5646	R&D
FSHR	Ratón	GTX71451	Genetex
TSPAN8	Ratón	MAB4734	R&D
Claudina-3	Ratón	MAB4620	R&D
Transferrina	Ratón	MAB2474	R&D
CD44s	Ratón	BBA10	R&D
CD44	Ratón	103002	Biolegend

Anticuerpo	Especie	Catálogo	Proveedor
E-Caderina	Ratón	324102	Biolegend
CEA		10-C10C	Fitzgerald
B7-H3		MAB1027	R&D
EMMPRIN	Ratón	MAB972	R&D
CD45	Ratón	304002	Biolegend
Calretinina	Ratón	sc-135853	Santa Cruz biotechnology
Ki67	Ratón	556003	BD Bioscience
Control de ratón IgG	Ratón	5414BF	Cell Signaling
Control de conejo IgG	Conejo	3900BF	Cell Signaling

Los conjugados de anticuerpo-ADN se evaluaron primero en células MDA-MB-231 (cáncer de mama humano). Las células se bloquearon para evitar el etiquetado inespecífico de ADN o anticuerpos y luego se "tiñeron" con el cóctel combinado siguiendo técnicas similares a la tinción de citometría de flujo estándar conocida en la técnica. A continuación, se liberó el ADN con un pulso de luz, se hibridó a códigos de barras fluorescentes y se grabó en un cartucho a través de un dispositivo de imagen acoplado a carga (CCD) (NanoString Technologies).

Se evaluaron y optimizaron varias conjugaciones de ADN usando varios enlazadores escindibles y los métodos de liberación correspondientes (Figuras 2 y 3). Entre los enlazadores escindibles probados, se seleccionó el enlazador fotoescindible por su rendimiento superior (Figura 2). La cuantificación de la sonda se tradujo en un perfil de muestra proteómica (Figura 1C) mediante la normalización de acuerdo con el ADN por anticuerpo y las proteínas de limpieza (Figura 4). En promedio, había alrededor de tres a cinco fragmentos de ADN por anticuerpo; se marcaron los marcadores con base en la unión no específica de los controles de IgG.

Análisis repetidos mostraron resultados consistentes en diferentes lotes de células analizadas en diferentes días y con el tiempo (Figura 5). En estudios posteriores, los anticuerpos que no cayeron por encima del umbral de IgG de control de 1.2 veces no se incluyeron [por ejemplo, dimetilhistona H3 (Lys⁴)]. Excluyendo estos valores atípicos, la mediana de SE en todos los anticuerpos fue del 6%. Se derivó un perfil de la línea humana MDA-MB-231 de aproximadamente 50 células y mostró, por ejemplo, alta expresión de queratina 7 y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), dos marcadores de diagnóstico comúnmente utilizados en laboratorios de patología para identificar subtipos de cáncer. Los marcadores epigenéticos y fosfoproteómicos tienen una expresión más baja porque estos ocurren naturalmente en menor abundancia en las células en relación con los marcadores extracelulares. También se pudieron detectar marcadores intracelulares como fosfo-Src (pSrc) y fosfo-glucógeno sintasa quinasa 3β (pGSK3β), por ejemplo, utilizando el método de permeabilización optimizado (Figuras 6A-6B).

Se realizaron experimentos de evaluación comparativa adicionales para demostrar la consistencia y reproducibilidad del ensayo. Los anticuerpos conjugados se comportaron de manera similar a los anticuerpos nativos, no modificados, como lo demuestra la comparación cabeza a cabeza en la citometría de flujo (Figura 7A). Se encontraron resultados similares al probar anticuerpos intracelulares como p53 y proteína ribosómica fosfo-S6 (pS6RP) con transferencias de puntos e inmunotransferencia (Figura 7B). Los conjugados de anticuerpo-ADN generan señales iguales o más fuertes en comparación con los anticuerpos nativos en las transferencias de puntos. Además, los anticuerpos modificados con ADN mostraron patrones de expresión similares en los lisados celulares en comparación con los anticuerpos nativos. Para evaluar la reproducibilidad, se demostró que dos clones de anticuerpos modificados con ADN específicos del mismo objetivo [por ejemplo, la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM)] dan niveles de expresión casi idénticos ($R^2 = 0.99$) a través de múltiples líneas celulares y muestras clínicas (Figura 8A). La tinción de anticuerpos se evaluó utilizando un cóctel de más de 60 anticuerpos y como agentes únicos; los niveles de expresión de ambos métodos, medidos por un código de barras de anticuerpos con plataforma de ADN fotoescindible (ABCD) como se describe aquí, mostraron una alta correlación lineal ($R^2 = 0.93$; Figura 8B). Los cambios en el marcador de proteína medidos con la plataforma ABCD se correlacionaron linealmente con los cambios de expresión medidos por estudios de inmunofluorescencia independientes en células de fibrosarcoma HT1080 tratadas con taxol (Figura 8C). Las mediciones de citometría de flujo a través de ocho líneas celulares y seis marcadores diferentes mostraron correlaciones lineales ($R^2 = 0.92$ a 0.99) (Figura 9).

Ejemplo 3. Sensibilidad unicelular de una realización de los métodos para la detección múltiple de moléculas diana de una muestra (código de barras de anticuerpos con plataforma de ADN fotoescindible (ABCD))

La sensibilidad de la plataforma ABCD se evaluó mediante la detección de diferentes números de células (50, 15, 10 o 5 células) de una muestra en masa de 500.000 células, en múltiples repeticiones, por dilución en serie (Figura 10A).

Las correlaciones entre los recuentos de ADN en masa y diluidos fueron lineales, con coeficientes de correlación >0.9 (Figura 10B). Se realizaron experimentos adicionales para validar la plataforma ABCD en células A431 humanas individuales. La Figura 10C muestra los niveles de expresión de 90 proteínas analizadas para cuatro células individuales elegidas al azar y en muestras a granel. De acuerdo con informes anteriores (13), hubo cierta heterogeneidad intercelular, pero en general, los perfiles unicelulares coincidieron con sus respectivos perfiles masivos con correlaciones tan altas como 0.96 y tan bajas como 0.63. Se excluyeron las células multinucleadas; las células fueron seleccionadas de otra manera al azar.

Para demostrar la variación biológica a nivel de células individuales, las células A431 humanas individuales no tratadas se compararon con las células tratadas con gefitinib, un inhibidor selectivo de la tirosina quinasa del EGFR. La agrupación no supervisada de células individuales mostró patrones únicos para los grupos tratados y no tratados (Figura 11A). Las líneas celulares A431 sobreexpresan EGFR y son altamente sensibles al gefitinib [concentración inhibitoria media (IC_{50}) = 100 nM], como se muestra por la inhibición generalizada de la vía en células A431 tratadas con gefitinib. Se aplicó un umbral a nivel de células individuales para garantizar que los niveles de expresión del marcador fueran detectables por encima de los seis controles IgG para todas las líneas celulares. La mayoría del panel todavía era detectable, aunque algunos marcadores como el fosfo-EGFR cayeron por debajo de los niveles umbral en algunas células, y por lo tanto no se incluyeron para la agrupación jerárquica. Sin embargo, las comparaciones por pares entre las dos cohortes mostraron cambios significativos en los marcadores clave (Figura 11B) como pS6RP, Ku80 y fosfohistona H3 (pH3). Estos cambios en los marcadores también fueron consistentes con los informes anteriores (14, 15). A diferencia de la mayoría de los estudios de inhibición de la señalización, la línea celular no tratada no se estimuló previamente con EGF antes del tratamiento. Por lo tanto, las condiciones del ensayo imitaron la variabilidad de la señalización natural para aproximar mejor las muestras de los pacientes.

Ejemplo 4. Medición de la heterogeneidad inter e intratumoral en muestras clínicas utilizando la plataforma ABCD

Para demostrar las capacidades clínicas de ABCD y explorar la heterogeneidad unicelular, se obtuvieron FNA de pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Las muestras de FNA de un solo paso se procesaron inicialmente usando selección magnética mediada por anticuerpos para aislar células positivas para EpCAM. Se recogieron células individuales para análisis posteriores mediante micromanipulación, mientras que se eliminaron otras unidades estructurales de muestra. En un paciente representativo, la expresión del marcador de proteína en 11 células individuales (EpCAM+/DAPI+/CD45-) se correlacionó con la medición en masa (aproximadamente 100 células restantes de FNA) (Figura 12A). Sin embargo, en general, la correlación entre las células del paciente y los FNA a granel fue menor y variada en comparación con las células individuales de las líneas celulares y su respectivo volumen en las Figuras 10A-10C. La correlación más alta con la medición en masa fue de 0.79 (el cultivo celular mostró $R = 0.96$), mientras que el valor más bajo fue de 0.43 (Figura 12B).

Luego se determinó la heterogeneidad interpaciente en muestras a granel de seis pacientes con adenocarcinoma de pulmón probado con biopsia (Figura 13). Aunque estos cánceres albergaban una histopatología idéntica, el perfil proteómico reveló claras diferencias, incluso en esta pequeña cohorte. Se eligieron paneles de marcadores para evaluar la heterogeneidad de proteínas en una amplia gama de redes de proteínas funcionales (16) relevantes para la evaluación de la terapia. La figura 13 muestra similitud visual entre los pacientes 1, 2 y 5 (Spearman $R_{1,2} = 0.94$, $R_{1,5} = 0.96$, $R_{2,5} = 0.95$). Esto coincidió parcialmente con el genotipificación porque los pacientes 1 y 2 tenían mutaciones EGFR T790M, mientras que el paciente 5 tenía una mutación KRAS (KRAS 35G>T). Esto indica que diferentes genotipos aún pueden producir fenotipos proteómicos similares. Los pacientes 3, 4 y 6 albergaban perfiles proteómicos distintos y mutaciones diferentes (Figura 13). El paciente 3 tenía una mutación EGFR del exón 20, mientras que el paciente 4 tenía una mutación EGFR L858R y una mutación BRAF adicional. Se observó que el paciente 6 tenía una translocación EML4-ALK.

La agrupación de proteínas también mostró posibles objetivos personalizados (Figura 13). Por ejemplo, el paciente 4 (EGFR/BRAF mutante) tenía quinasa 1/2 regulada por señal fosfoextracelular alta (pERK1/2) y pS6RP, como se esperaba para un paciente con una mutación EGFR L588R; sin embargo, este paciente también mostró un alto nivel de los marcadores de reparación/daño del ADN poli(adenosina difosfato-ribosa) polimerasa (PARP), Ku80 y expresión de fosfohistona H2A.X (pH2A.X), lo que indica que los inhibidores de PARP o el ADN agentes dañinos (por ejemplo, cisplatino) podrían ser efectivos para este paciente. Por lo tanto, dicha información determinada por métodos para detectar una pluralidad de moléculas diana como se describe en el presente documento (por ejemplo, plataforma ABCD) puede usarse para complementar la farmacogenómica.

Ejemplo 5. Discriminación in vitro de análisis de vía durante el tratamiento utilizando la plataforma ABCD

Una vez establecida la viabilidad de los análisis inter e intrapacientes en muestras clínicas, se buscó explorar la viabilidad de controlar el tratamiento del cáncer a lo largo del tiempo. Con este fin, primero se buscó determinar si las respuestas de la vía conocida a los diferentes tratamientos farmacológicos podrían ser discriminadas. La figura 14A muestra la validación de que las células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-436) tratadas con inhibidores de quinasa (gefitinib y PKI-587), fármacos de anticuerpos (cetuximab) y fármacos que dañan el ADN (olaparib y cisplatino) mostraron perfiles que se agruparon de acuerdo con el mecanismo de acción del fármaco. Como estudio de control, las líneas celulares tratadas con cetuximab dieron como resultado la inhibición esperada del fármaco (Figura 15B). Se demostró la inhibición esperada de proteínas en líneas celulares de cáncer humano sensibles al

fármaco utilizando dosis optimizadas de fármacos y tiempos de incubación utilizando la plataforma ABCD. Ejemplos notables incluyen pS6RP para tratamientos dirigidos y pH2A.X, sustrato pATM/ATR (fosfo-ataxia telangiectasia mutada/ATM- y Rad3), y PARP escindido para agentes que dañan el ADN. También se encontraron resultados inesperados, como modificaciones de histonas epigenéticas después del tratamiento con un inhibidor de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3Ki) (Figura 15E). Para la validación adicional in vitro del tratamiento, las líneas celulares de fibrosarcoma HT1080 se trataron con cuatro dosis diferentes de taxol. Varios marcadores del panel mostraron cambios de dosis-respuesta al tratamiento con taxol, incluidos pERK y fosfo-ciclina D.

El perfil proteómico de los tratamientos con olaparib y cisplatino se realizó para cuatro líneas celulares de cáncer humano, mostrando sensibilidades farmacológicas variables medidas mediante ensayos de viabilidad (Figuras 14A-14B y Figura 15A). El grado de cambio en los perfiles de proteínas se cuantificó calculando el número de marcadores que eran significativamente diferentes de la condición no tratada usando la prueba t por pares [tasa de descubrimiento falso (FDR)=0.1]. Este perfil indicaba que los cambios farmacodinámicos globales se correlacionaban con la sensibilidad del tratamiento: a medida que disminuían los valores de IC₅₀, aumentaba el número de marcadores proteicos con cambios significativos (Fig. 14B). Para líneas celulares resistentes (por ejemplo, OVCA429), no se detectaron cambios significativos. También se detectaron cambios esperados en el daño del ADN y los marcadores de apoptosis, como la degradación de Bim y la regulación positiva de pERK (Figuras 15C-15D), lo que indica estudios previos de respuesta al daño del ADN al tratamiento con cisplatino (17).

Para evaluar la capacidad del ensayo para medir incluso pequeños cambios de marcadores, las células de fibrosarcoma humano HT1080 se trataron con taxol a cinco dosis diferentes. Los cambios en los marcadores a dosis altas se compararon con los cambios en los marcadores cuantificados por una pantalla de inmunofluorescencia independiente (Figura 16A). Varios marcadores de proteínas mostraron curvas de dosis-respuesta, incluyendo CDCP1, fosfo-ciclina D, ciclina E1, factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), BRCA2 y pERK1/2. Estos estudios in vitro establecieron que el panel de marcadores podría medir los cambios en la vía en respuesta a los diferentes mecanismos farmacológicos; además, estos cambios podrían detectarse de una manera sensible y dependiente de la dosis. Además, las pruebas t por parejas entre las células dosificadas y no tratadas mostraron un aumento en los cambios significativos de marcadores a la dosis más alta (taxol 700 nM) en comparación con la dosis más baja de 70 nM (Figuras 16B y 16C).

Ejemplo 6. Seguimiento de la respuesta al tratamiento con PI3Ki en pacientes con cáncer

En algunas realizaciones, es deseable traducir estos análisis de ruta a muestras de pacientes, por ejemplo, analizar biopsias en serie en ensayos clínicos de fase temprana con el objetivo de evaluar mejor la eficacia y la dosificación del fármaco. Sin embargo, tales procedimientos invasivos pueden presentar riesgo de morbilidad y altos costes. La capacidad de analizar pequeñas cantidades de células de fuentes alternativas (por ejemplo, FNA) se vuelve primordial cuando los tumores sensibles se reducen después del tratamiento, lo que dificulta la repetición de biopsias. Como prueba de concepto, se realizaron análisis celulares escasos en cuatro pacientes antes y después del tratamiento con PI3Ki durante los ensayos de aumento de dosis de fase 1 (Figura 17A). Se recogieron muestras de pretratamiento el día anterior a la primera dosis del fármaco; las muestras posteriores al tratamiento se recogieron al final del segundo ciclo de tratamiento. La recolección y el procesamiento ocurrieron en el transcurso de un año para correlacionar los perfiles con la respuesta del paciente. Los cuatro pacientes tenían cánceres metastásicos de varios subtipos y fueron seleccionados sobre la base de mutaciones genéticas de PI3K que podrían predisponer a sus tumores a la inhibición de la vía mediante el tratamiento con PI3Ki. En total, dos pacientes respondieron y dos progresaron. El análisis de los datos se realizó de manera ciega. La agrupación no supervisada separó dos grupos de respondedores versus no respondedores (Figura 17A). Entre los dos respondedores, un paciente mostró cambios de pliegue más grandes en el panel marcador. El desenmascaramiento posterior reveló que este paciente recibió una dosis más alta del fármaco durante la escalada de la fase 1 que el otro paciente que respondió. Se pueden usar muestras de pacientes adicionales para medir el impacto clínico de la plataforma ABCD durante los estudios de la vía de dosificación de medicamentos.

En algunas realizaciones, la exploración realizada por la plataforma ABCD podría ayudar a predecir el resultado clínico o identificar marcadores prometedores de respuesta al tratamiento. Para demostrar esto, se perfilaron cinco pacientes sin tratamiento farmacológico, todos con diversas mutaciones de PI3K, que eventualmente recibieron tratamiento con PI3Ki de molécula pequeña. Los pacientes fueron categorizados como no respondedores o respondedores (Figura 17B) y se utilizó un algoritmo de clasificación de marcadores para determinar los principales marcadores diferenciales. El marcador superior, la dimetilación de la histona H3 en Lys79 (H3K79me2), se agrupó con varios marcadores: pS6RP (un objetivo conocido corriente abajo de PI3K y un biomarcador clave emergente de respuesta al tratamiento) (14), pH2A.X y PARP. Según la señalización de la vía canónica, la selección de marcadores de daño epigenético o de ADN como lecturas de la respuesta al tratamiento PI3K no sería una decisión intuitiva. El daño en el ADN y los cambios en el marcador epigenético también se identificaron mediante el perfil in vitro de un PI3Ki (Figuras 15C-15E). Este grupo cubrió diversas proteínas a través de diversas vías: cambios epigenéticos, daño en el ADN y vías de crecimiento y supervivencia [PI3K y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)], lo que indica el valor potencial de la creación de perfiles en todo el sistema para desarrollar mejores diagnósticos complementarios durante el tratamiento.

Discusión basada en los ejemplos 1-6

En algunas realizaciones, se presenta aquí un método sin amplificación capaz de detectar cientos de proteínas en células humanas mediante el uso de una o más realizaciones de sondas diana descritas en este documento (por ejemplo, anticuerpos con código de barras de ADN) junto con lecturas ópticas altamente sensibles. El etiquetado celular, el lavado y el análisis se pueden completar en cuestión de horas, lo que hace posible el análisis de proteínas en el mismo día. El método mide más marcadores en material limitado que la inmunohistoquímica y preserva el material genético de las muestras, lo que no es posible con herramientas tradicionales como la citometría multiplexada (18). La cobertura de proteínas y/o los métodos descritos en este documento pueden extenderse para incluir objetivos de proteínas adicionales y/u otras moléculas diana a través de la conjugación de moléculas diana a secuencias de nucleótidos de identificación (por ejemplo, Conjugaciones de anticuerpos y ADN), lo que resulta en una molécula diana multiplexada y escalable (por ejemplo, plataforma de detección de proteínas).

En general, el método puede proporcionar análisis de los niveles de expresión de proteínas para poblaciones de células individuales y en masa. Los estudios in vitro que se muestran en los Ejemplos mostraron que las células individuales de las líneas celulares mostraron una correlación más alta con las mediciones en masa que las aisladas de los tumores de los pacientes. En los FNA, las células individuales también mostraron correlaciones más altas entre sí que con la población en masa. Esto podría ser, por ejemplo, porque una medición de volumen promedio es menos probable que se correlacione fuertemente con un solo fenotipo clonal.

Los resultados presentados en el presente documento mostraron que los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para detectar proteínas extracelulares (por ejemplo, pero sin limitación, CD44, EGFR), proteínas intracelulares/citosólicas (por ejemplo, pero sin limitarse a, p-S6RP), y/o proteínas intracelulares/nucleares (por ejemplo, 53BP1) en una muestra.

Los hallazgos presentados en el presente documento también mostraron que los modelos actuales de cultivo celular son una estimación insuficiente de la heterogeneidad proteómica en muestras clínicas. Por lo tanto, los métodos para detectar una pluralidad de moléculas diana de una muestra descrita en el presente documento (por ejemplo, la herramienta de plataforma ABCD) son útiles por su capacidad para estudiar células individuales raras en muestras clínicas, como células tumorales circulantes, células madre y poblaciones de células inmunes. Como se muestra aquí, incluso las proteínas escasas, como 53BP1 y pH2A.X, podrían detectarse a nivel de células individuales. El mapeo de proteínas a gran escala de células aisladas, raras y poblaciones clonales podría arrojar información sobre la heterogeneidad del cáncer, la resistencia a los medicamentos y la utilidad clínica de las células tumorales circulantes. La heterogeneidad intratumoral en sí misma puede ser un biomarcador de mal resultado clínico (19). Por lo tanto, los métodos descritos en este documento (por ejemplo, plataforma ABCD) se pueden usar para determinar la heterogeneidad intratumoral, que se puede usar como un biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico. Establecer correlaciones causales y reactivas entre enfermedades y biomarcadores alterados también podría mejorar radicalmente la capacidad de los médicos para diagnosticar y tratar pacientes (20, 21). En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento (por ejemplo, plataforma ABCD) se pueden usar para determinar correlaciones causales y reactivas entre enfermedades y biomarcadores alterados para mejorar las capacidades de los médicos para diagnosticar y/o tratar pacientes.

Los inventores han demostrado la facilidad de uso, la reproducibilidad, la compatibilidad del método ABCD con aplicaciones clínicas, tales como la elaboración de perfiles de muestras de cáncer FNA, y su potencial de traducción para controlar el tratamiento del cáncer como se demostró en cuatro pacientes. Los hallazgos mostraron que un perfil más amplio puede mejorar la comprensión sobre los biomarcadores de diagnóstico complementarios potencialmente útiles y ayudar a explorar cómo la dosificación de medicamentos corresponde a la farmacodinámica celular. Una selección de marcadores de proteínas más inteligente, como lo demuestra la plataforma ABCD, podría reducir notablemente los costes de desarrollo de fármacos, reducir las cohortes de pacientes y mejorar el diseño de los ensayos clínicos.

Los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, Plataforma ABCD) podrían complementar otras técnicas proteómicas de células individuales reconocidas en la técnica, tales como citometría de masas e inmunofluorescencia multiplexada inactivada con fluoróforo (8, 22). Una de las ventajas de los métodos descritos en este documento (por ejemplo, la plataforma ABCD) es que tanto el material genético como los códigos de barras de proteínas pueden extraerse simultáneamente de una sola muestra, allanando así el camino para análisis biológicamente más relevantes de las interrelaciones proteína-ADN-ARN. Dichas medidas integradoras podrían explicar "piezas faltantes" en la genómica asociada con diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, la genómica del cáncer. Por ejemplo, en los ejemplos presentados aquí, no todos los pacientes con mutaciones de ADN PIK3CA respondieron a un PI3Ki dado; esto es consistente con la experiencia clínica (23, 24). Sin embargo, los biomarcadores proteómicos revelaron cambios diferenciales entre las cohortes con y sin respuesta. Ejemplos indican que los perfiles de proteínas ayudarán a complementar el genotipo para dar forma a los avances terapéuticos para el cáncer y otras enfermedades.

Los ejemplos presentados en el presente documento demostraron una prueba de principio de que la tecnología descrita en el presente documento puede funcionar en muestras clínicas con una amplia gama de aplicaciones, incluyendo perfiles de células raras y diagnósticos complementarios en ensayos clínicos sobre cáncer.

En algunas realizaciones, la tecnología descrita en este documento (por ejemplo, plataforma ABCD) puede modificarse para adaptarse a las necesidades de diversas aplicaciones. Por ejemplo, los métodos descritos en este documento (por ejemplo, Plataforma ABCD) se pueden adaptar para trabajar con células enteras y/o lisados celulares, y el ADN se puede cuantificar con otras lecturas (por ejemplo, secuenciación) para realizar mediciones simultáneas de ARN, ADN, epigenética y expresión de proteínas. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento (por ejemplo, plataforma ABCD) pueden incluir un módulo para aislar y medir rápidamente poblaciones enteras de células individuales. Por ejemplo, se pueden agregar componentes y pozos adicionales a dispositivos para microfluidos como el que se describe en los Ejemplos para aumentar el rendimiento del análisis de células individuales.

Los estudios unicelulares se pueden validar con un dispositivo de mayor rendimiento. Por ejemplo, se puede usar un mayor número de células para comparar las diferencias de población y los diferenciales entre los métodos descritos aquí y otros estándares de oro (por ejemplo, citometría de flujo). En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento (por ejemplo, plataforma ABCD) se pueden usar para identificar nuevos marcadores de diagnóstico complementarios o marcadores de ruta específicos para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, subtipos de cáncer) y/o monitorizar la respuesta terapéutica de los pacientes.

Los métodos descritos en este documento (por ejemplo, plataforma ABCD) pueden permitir estudios a mayor escala para proporcionar información mecanicista sobre estrategias terapéuticas nuevas y/o existentes. Además, los métodos descritos en este documento (por ejemplo, Plataforma ABCD) también se pueden usar para perfiles raros de células individuales (por ejemplo, pero sin limitarse a células tumorales circulantes) para obtener una mayor comprensión de su relevancia biológica y clínica. Debido a que se conserva el material genético de las muestras, los métodos descritos en este documento (por ejemplo, la plataforma ABCD) se pueden adaptar para estudiar proteínas que interactúan con elementos reguladores genéticos como los microARN. Los métodos descritos en este documento (por ejemplo, la plataforma ABCD) se pueden usar para diversas aplicaciones en laboratorios de investigación, hospitales académicos y compañías farmacéuticas para ayudar a impulsar los ensayos farmacológicos y la investigación biológica.

Materiales y métodos de ejemplo para los Ejemplos 1-6

Diseño del estudio. Para determinar si las redes de proteínas (a diferencia de los biomarcadores individuales) revelarán información clínica o biológica sobre cómo una enfermedad o afección (por ejemplo, cánceres) evoluciona y responde a los medicamentos, una plataforma multiplexada para detectar la expresión de proteínas, por ejemplo, en muestras clínicas y en líneas celulares, se desarrolló. Ejemplos en este documento demuestran el uso de los métodos descritos en este documento (por ejemplo, la plataforma ABCD) para comprender la respuesta al tratamiento en el cáncer.

Se realizaron estudios clínicos en cohortes limitadas de pacientes como prueba de principio. El número de pacientes se seleccionó en función de un ciclo de inscripción de 1 año (marzo de 2012 a marzo de 2013). Todas las mediciones de proteínas se incluyeron siempre que sus señales estuvieran por encima de un umbral predeterminado. En una realización, el umbral era ~1.2 veces mayor que el de su correspondiente isotipo de IgG inespecífica. Se estableció que este umbral era más de tres veces la mediana de SE de las cohortes de anticuerpos agrupadas. Solo se incluyeron los anticuerpos que fueron validados (mediante mediciones de citometría de flujo en líneas celulares). Todos los estudios in vitro se realizaron en réplicas (n=3, a menos que se especifique lo contrario). Después de la optimización, los estudios con el protocolo final se repitieron varias veces en diferentes días para garantizar la coherencia y la reproducibilidad. Todos los experimentos en estudios clínicos se realizaron a ciegas durante los procedimientos experimentales y el análisis de datos sin procesar.

Líneas celulares. Los experimentos de validación se realizaron en las siguientes líneas celulares, que se compraron de la American Type Culture Collection (ATCC): SKOV3, ES-2, OVCA429, UCI-107, UCI-101, TOV-112D, TOV-21G, A2780, MDA -MB-231, MDA-MB-436, A431 y HT1080. Las células se pasaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (Cellgro) o RPMI (Cellgro) según lo recomendado por ATCC. Las líneas celulares se derivaron de cepillados de epitelio de superficie ovárica (OSE) cultivados en medio 1:1 199/MCDB 105 (Sigma-Aldrich) con gentamicina (25 µg/ml) y suero inactivado por calor al 15%. Las líneas celulares TIOSE6 se obtuvieron mediante transfección de hTERT en células NOSE mantenidas en medio 1:1 199/MCDB 105 con gentamicina (25 µg/ml), suero inactivado por calor al 15% y G418 (500 µg/ml) (25). Después de la tripsinización, las células se fijaron inmediatamente con 1 × regulador Lyse/Fix (BD Bioscience) durante 10 minutos a 37°C y luego se lavaron dos veces con SB+ [solución salina regulada con fosfato (PBS) con albúmina de suero bovino (BSA) al 2%]. Las células se dividieron en alícuotas en tubos (~1 × 10⁶ células/ml) y se almacenaron a -20°C hasta el etiquetado. Las repeticiones biológicas se sembraron en diferentes pozos y se recolectaron por separado. Las células cultivadas se procesaron y almacenaron exactamente en las mismas condiciones que las muestras clínicas. Se prepararon y analizaron un total de 276 muestras de forma independiente mediante el método de código de barras.

Muestras clínicas. El estudio fue aprobado por la Junta de the Institutional Review Board at the Dana-Farber/Harvard Cancer Center, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos (n=10). Se realizaron catorce procedimientos mínimamente invasivos en los 10 pacientes incluidos. Seis pacientes tenían adenocarcinomas pulmonares primarios. Los cuatro pacientes sometidos a tratamiento con PI3Ki con biopsias repetidas tenían carcinomas de diversos orígenes en el abdomen, todos con mutaciones subyacentes de PI3K. Todas las biopsias de pretratamiento se recogieron en la semana anterior al primer ciclo de tratamiento. Todas las biopsias posteriores al tratamiento se recolectaron después de completar un ciclo, generalmente después de varias semanas o meses. Se

obtuvieron FNA guiados por imágenes con una aguja de calibre 22 antes de las biopsias de rutina del núcleo. La ubicación correcta de la aguja se confirmó mediante tomografía computarizada y lectura en tiempo real por citopatología. Las muestras de FNA se procesaron inmediatamente por centrifugación y eliminación del exceso de PBS. Si había grupos visuales presentes antes del paso de fijación, se añadió collagenasa (Sigma-Aldrich) a 0.2 mg/ml. Las células se fijaron con regulador Lyse/Fix (BD Biosciences) durante 10 minutos a 37°C y se lavaron dos veces con PBS con BSA al 2%. Todas las centrifugaciones se realizaron a 300 g durante 5 min. Las muestras clínicas se almacenaron a -20°C. Se prepararon y analizaron un total de 24 muestras de forma independiente mediante el método de código de barras.

Tratamientos farmacológicos de líneas celulares. Para probar el efecto del tratamiento farmacológico en los niveles de expresión de proteínas, las líneas celulares se trataron con una serie de diferentes fármacos quimioterapéuticos o dirigidos molecularmente. Las líneas celulares A431 se dosificaron con gefitinib (Selleck Chemicals) en medio con dimetilsulfóxido al 1% (DMSO) durante 12 horas a una concentración de 10 µM. La línea celular de cáncer de mama humano triple negativo MDA-MB-436 se dosificó con el inhibidor de PARP olaparib (10 µM en DMSO al 0.1% en medio), cisplatino (10 µM, solución salina equilibrada de Hanks al 1% en medio), la PI3K/mTOR inhibidor PKI-587 (100 nM, 0.1% DMSO/medio) y los inhibidores EGFR cetuximab (75 µg/ml en medio) y gefitinib (10 µM en 0.1% DMSO/medio). Todos los agentes dirigidos molecularmente (PKI-587, cetuximab y gefitinib) se aplicaron durante 12 horas. Los agentes que dañan el ADN olaparib y cisplatino se aplicaron a las células durante 3 días. Los cambios en los niveles de expresión de proteínas se compararon con controles medios en condiciones idénticas, pero sin tratamiento farmacológico.

Citometría de flujo. La citometría de flujo se utilizó para validar los niveles de expresión de proteínas en muestras a granel. Las células fijas almacenadas a -20°C se descongelaron y luego se permeabilizaron con un regulador a base de saponina, PW+ (1× Perm/Wash Phosflow Regulador, BD Biosciences, con 2% de BSA). Se incubaron aproximadamente 200.000 células por tubo con anticuerpos primarios durante 1 hora a 1 µg/ml o la dilución apropiada según lo recomendado por Cell Signaling para aplicaciones de citometría de flujo. Una lista de ejemplos de anticuerpos primarios se muestra en la Tabla 1 anterior. Después de un lavado con PW+, se aplicaron los anticuerpos secundarios apropiados dirigidos a IgG de ratón, humano o conejo. Los anticuerpos secundarios específicos utilizados fueron anti-conejo IgG (H+L) F(ab')₂ Fragment Alexa Fluor 647 Conjugate (Cell Signaling #4414), anti-ratón IgG (H+L) F(ab')₂ Fragment Alexa Fluor 647 (Cell Signaling #4410), y FITC antihumano (Abcam ab98623). Los niveles de expresión para cada proteína se calcularon normalizando la media geométrica de cada anticuerpo con la IgG de control apropiada. Estos valores se correlacionaron con los valores de expresión derivados de la técnica de código de barras de ADN.

Síntesis del enlazador bifuncional de ADN-anticuerpo fotoescindible. El enlazador fotoescindible se sintetizó como se describió previamente en la Ref. 9. Por ejemplo, el compuesto 1 (Figura 2B, ~0.100 g, 0.334 mmol) se dispersó en 5 ml de diclorometano seco (DCM) en un matraz de fondo redondo en atmósfera de argón. El matraz se enfrió a 0°C colocándolo en un baño de hielo. Se añadieron 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-hexafluorofosfato de tetrametiluronio (HBTU) (0.139 g, 0.368 mmol) y trietilamina (TEA) (109 µl, 0.835 mmol) a la solución. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 5 minutos, y posteriormente se añadió sal de trifluoroacetato de N-(2-aminoetil)maleimida (0.093 mg, 0.368 mmol). Después de agitar a 0°C durante 15 minutos, la mezcla de reacción se dejó equilibrar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 18 h. Después de que la mezcla de reacción se diluyó con DCM (45 ml), la fase orgánica se lavó con agua y solución saturada de NaCl, luego se secó sobre sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró a presión reducida y se cargó en una columna de SiO₂ (eluyente: 100% DCM a 3% metanol en DCM, v/v) para purificación. El rendimiento del compuesto 2 fue aproximadamente del 60%. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): 7.58 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.77 (s, 2H), 5.44 (q, ⁴J = 6 Hz, 1H), 4.03 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.61 (t, 3J = 5.6 Hz, 2H), 3.35 (t, 2H, solapando con el pico residual del solvente), 2.32 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H), 2.05 (m, ³H), 1.46 (d, ²J = 6.4 Hz, 3H). MS (espectrometría de masas por ionización por electroaspersión: ESI-MS) calculado: 421.15, encontrado: 466.18 [M+HCOO]⁻.

El compuesto 2 (0.010 g, 0.024 mmol) se disolvió en dimetilformamida anhidra (DMF) (1 ml). Se añadieron sucesivamente a la solución carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC; 0.018 mg, 0.071 mmol) y TEA (12.5 µl, 0.096 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se cargó directamente en una columna de fase inversa C18 para purificación (eluyente: acetonitrilo al 5% en agua a acetonitrilo al 95% en agua, v/v). El rendimiento del producto enlazador bifuncional fotoescindible fue aproximadamente del 70%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.63 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.67 (s, 2H), 6.48 (q, ⁴J = 6.4 Hz, 1H), 6.03 (br, 1H), 4.08 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.68 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 2.79 (s, 4H), 2.36 (t, 3J = 7 Hz, 2H), 2.15 (m, 3H), 1.75 (d, ²J = 6.4 Hz, 3H). ESI-MS calculado: 562.15, encontrado: 607.22 [M+HCOO]⁻.

Conjugaciones de ADN-anticuerpo. Los anticuerpos (por ejemplo, enumerados en la Tabla 1) se conjugaron con secuencias de ADN foráneas especialmente diseñadas derivadas del genoma de la patata (secuencias de ejemplo mostradas en la Tabla 2).

Tabla 2. Lista de ejemplos de secuencias foráneas 70-mero utilizadas para codificar una molécula de unión a la diana

Secuencia diana	T _m sonda de captura (°C)	T _m sonda informadora (°C)
GCTAAGTTTGAATTAAGAAAGGAGTTGCTGGAGGTCCTTTCCAGCATAAG AACCAGCCATATTGCTTAA (SEQ ID NO: 1)	79	79
TGCCTTCTGAAAGAGACGTTATTGTTGAAGCAAGAGATAGCTTAGTAACAA ATGCTATAGCTCAGGCAGG (SEQ ID NO: 2)	80	78
CCTGATCATGCTTTGTCAGCAGACCCAGAAGAATTCATCACAATCACTGGA AGATTGAGCTTAGGAAAGT (SEQ ID NO: 3)	82	78
GAGCGGATGTTATTGAGAAGCACTTTACCTTAGATTTCTAAAGCTCTCTTCC TCCTCTCTTCTCCGCTCA (SEQ ID NO: 4)	78	82
ATCGGCTGTGCGATTGCTATTGATGTGTTAAGAAATTTGGTTTGTGATTGGC AAATCTCTCCTCCAATC (SEQ ID NO: 5)	80	81
ATTTGGATGAAGTCGGCTTTATGGTGACACAAATCATGATGAGCTGAGGTT CTGACAGCAAATACGCTCA (SEQ ID NO: 6)	79	82
ATAGAACCATTTGCTGATGAGGTGACAACAGATCGTTGCACTTATGCTATC CCGTTAGACTATCTGCTAT (SEQ ID NO: 7)	80	78
ACTACCATGTACTGCGCGAGACTAGCCTATCATTGGATTGCAGCGATGACT ATATCTGAGCACCTGTGAC (SEQ ID NO: 8)	82	81
ATATGAGACGACTAGCACGCCATAGCGTTACATACGTGTCGATCCGAGAAC ATCACTCTAATGACGAGTG (SEQ ID NO: 9)	80	81
CATCATCGACAGTTCGCAGCCCTATAACATGATACTAGATAACGATGCTCC ATGTTAGTGAATGCGAGTC (SEQ ID NO: 10)	80	79
ACTCACACATAGTACTGACACGTAAGATAGGATGCTATATGGTCATTGGTC ACCCGAGTTACGATCAAAT (SEQ ID NO: 11)	79	79
CAGATAGACTCACCTCGATATACAGGGAGCCACGACTTAGGACTATGGATA AGTCATCTAAAGCGTCCGA (SEQ ID NO: 12)	82	78

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
CACTGTCTATACATGGACGACACTTTGCACATCATTACCAAAGAGCGCAAC GTATCTAGGATTGAGCAGT (SEQ ID NO: 13)	80	81
AGACTAATTGATCGGACCGATGACAGTTCACAGAGGGATACACTGTTGAGC CGACCCTATTAGCTGATAT (SEQ ID NO: 14)	80	80
TGATCCACACTGACGAATCATGTACTCACTCGATCGCCACTTCACACAAGA ACACAAATTTGGAGTATTG (SEQ ID NO: 15)	80	79
CTCGAGAATCACACACAGTCGTCTAAGACACGACAAGTGCAACAGCAATC CACATCTTAGATGAGATTAG (SEQ ID NO: 16)	81	78
CGATTACAAGGCGTGGTCAGATATTAGACTCCAGGGGATTTAATGCCAGTC CAAGCTCTCTCCACATTC (SEQ ID NO: 17)	81	81
ATCTGCATGAACGGGAAAGGAGTTCGATGAGACTTTCAAACCAACATAATG TCTCTCCAACCTCAGGAAG (SEQ ID NO: 18)	82	80
ATAGTCTTTAGAGCCTCAGAATAGGCTGTGACGCGGAAGATAAATCATAAG TGCCCTCCCTCGGTAATTTG (SEQ ID NO: 19)	82	79
GCCAGGTATGCCGTGAACGAGTTCTTCATTAATGTTATGTCTCGGGAGTCT GATATTGGTACTTCTCCC (SEQ ID NO: 20)	82	80
TTAGCACCGATATCAATACTGATGATGTACCGTCGAGCTCGTGTTGAACC CTCAAGTAACAACCTGAC (SEQ ID NO: 21)	79	82
ACTTGTTGACTGACAGTTTAACGCCTGACATGAACGGCTTGCTTATAATGA CTGGCAGGGTTATGAATG (SEQ ID NO: 22)	81	81
AAACTGACCGTACCGTTAGAAGAGAGTTCCGCTTCTCTCATGATGTGCGCA TCTCCACATTATTTGACC (SEQ ID NO: 23)	82	81
TGATGACAGTGACAATTGACCGAATTGCCTGATCATTACCTTACAGTGCGC AGATTGGGATAATCGATTT (SEQ ID NO: 24)	81	79

ES 2 887 726 T3

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
TAGGCGTTGAGGCTTTGTTTCTTTGCCTCTATTGTAAGACTCATTCTGACGG CCTCTAGTCGTTGATATG (SEQ ID NO: 25)	81	80
AAGGACATTCTTTCGAATGCAAGTTCAAGGCACATTTTCTATATCAGCCAC CATGGGAGTGACATTTCTT (SEQ ID NO: 26)	80	79
CAATAGCTCCAGTAGTAATTGTTGTCGCTCCGCTGAGCAGTTAATCCTTATG TCAACAACCTCAGCATAG (SEQ ID NO: 27)	82	78
TTCACCAAGCTGAACAGGGTTGCGCTGAATAAAATTTACAGGATACTATGG ACAGGTTTCAGAATCCTCGA (SEQ ID NO: 28)	82	79
GGAATGAATCCATTGCATTTCCATGAGAATGCAGACTTAATCGGACGTATC GACTTTGGGTCCACGATAT (SEQ ID NO: 29)	79	80
GAGGTCTTGTTTCATCTAAACCGAGCAGGATGATAAGCCATAATTCGTAAC CCGAGGGTATAATTCGTTA (SEQ ID NO: 30)	79	79
GTCCTTCTGCTTATGACATTCCGTGCATTCCGTAGCTACGTCAAGCGTTACA TAGTGACGGAAGTGTAG (SEQ ID NO: 31)	82	80
TCTGTACCTTGGCACTCCATCTGGTAAGTCACTTATAGTTGTATGGTTTCAG ATGAGGGAACGTGTAGGA (SEQ ID NO: 32)	81	80
AATTTCTGAGATTGTTGGTAGAGGGAGAAATGGGAAGGACATGTTTCAACA ATCACCGGATTAAAGCCTT (SEQ ID NO: 33)	79	80
TGTGGAAGGACTGTGATAAACCAATAGGGTGTCAAGATCTGTAAGTATGGG ATTAGGGATGTTCTGCCAG (SEQ ID NO: 34)	80	80
GCCGTCGGACATAACCACTTGATATATACGTAGTTCATCAACCTTAACTC CCTCTGGGTTTCATTGGGAG (SEQ ID NO: 35)	80	82
GCTATTGCAGCAAAGAGAACAGACGCTTTAACTGGTATCGAGCGCTTAGAT GGCTATATGGTCTACTAGA (SEQ ID NO: 36)	81	78

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
GAAATCAGATCAGTTCTACATTCCGGTGGGAGCCCTCTATATGATTAGATCCTGCAGCCGTACTTCCGTCA (SEQ ID NO: 37)	82	80
GGTGGCTTGATTAACTGAATCAGGCCCTAACCATTGTATTGTGTCTACACTGGTCCGTCTTAGACGC (SEQ ID NO: 38)	82	81
GTTGTTTACCTTGATAGATCGACTTCACATCAGCGGCAGAAGGCCCTCAACGTAAATCTGCTCCACATTTA (SEQ ID NO: 39)	80	81
TGTTGACATCCGCAACAATGTACCTTATATCGGCATATGGATCTCTTGATCGAGCGAACCTCCCTTTAAC (SEQ ID NO: 40)	81	80
AAGGTGATTCACTAACCAGCTCTTACTCCTCGTTCGGTAGCAAATGAAATGCCGGATGCTGTTGAAGTAG (SEQ ID NO: 41)	80	81
CGCATAACTCGAACCACAGTTACTATCAGTCGACATCCCACCAGAGAAATTGAAGGATATTGTTGAAGCA (SEQ ID NO: 42)	80	79
GAATCTTGGAAGGTTTCCAGTTAAATAGGGCGTGCGAAGATTCCAGGCAGATTTCTCAGGAATTCAGTCA (SEQ ID NO: 43)	81	80
CTGCTAATGCTGATGGCCACCTTCTCTATTTGTGCGCCATTATATGCGTTGAGGTTAGTTCAAGCAATAC (SEQ ID NO: 44)	82	78
GAACAGCTTTCCTTGCTCCCTCTAAATCACCATTTCATTAGATGAAACCGACTTCATTCCAGACTCAAT (SEQ ID NO: 45)	80	78
AATGCATTTGCCAATGTAGCCATTGTATAACCAGATACACTAGTCCAATGTCTCAACCAGGGATACCACA (SEQ ID NO: 46)	79	81
CTCAGAGCTTCAAATCTATCCTCTGGAATCTCTGTATAAGCCCTCGAATACAATTGAGGTATCCCGCAT (SEQ ID NO: 47)	79	81
CTCTTCTGCCCTACATCACTATCGACTATAGCAACATATCTTTCTCGGGTAAAGATTAGGCGTCCGATAT (SEQ ID NO: 48)	79	78

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
GTAACCGTAGTCGCGCAAACCGTTATATTACGGATATGATCCAAGTTATATACATTAGGACGCGGTTGCT (SEQ ID NO: 49)	81	79
ATGGTTAGTAAACAGCTTTGATTTCTACATCCGCCTAGCAAACCCATAGTTC TGCAGTAGATTCACAGCG (SEQ ID NO: 50)	79	81
TTCAGTTATAATGTGTCCAGCAGAAGCAGGAATTGAATTACCCAAGTTGCA AGTGGAAGATTGGAGTTA (SEQ ID NO: 51)	79	78
TTGCAGAAGCATTCCCAATATGGGTTTCAAGAGTTTAAAGAATGTGGAACA TTCATGGGAACTGGTGAAG (SEQ ID NO: 52)	80	79
GCAACAACCTCATCTATACTGTGAATAGTCCCTCCGCTGTCTATATTGGAAC TGCTGCAATGGTTGCTCT (SEQ ID NO: 53)	80	82
CCGCAGATTATCGTTTACGATGCATCCATGGTCTCCGACCCATTGAGAGAG CCAATGGAATTAAGAACTT (SEQ ID NO: 54)	82	80
CACCATTGAGCCTGATATTGCGTTTGGTGTGATGTGGCAACTGCATACTGA ATAACCTCCCTGAAATAGC (SEQ ID NO: 55)	81	80
CGTTACATACTCAGCCATAGGCTTCGATAACAGCATTATTGGAACCTCTGG GACATTAACAGAGACAACA (SEQ ID NO: 56)	81	79
AGCGTACTAGGCATCTATTGGCTGAACTACCATGTAATTAGTGGTGTTCCA GCCTCTAAGATGATGTGGT (SEQ ID NO: 57)	81	80
GATAGGATGCGACTGCGTATCATATAGGCTGCACATTAGCTGTTGCTTCAA ATGCCAATCTTACCTCAAC (SEQ ID NO: 58)	82	79
AATGTATGAGCGGACACTATGCTAAGAGAGACTCCATCAATCCCTCTATGC AAGATAACAACATCTGGCT (SEQ ID NO: 59)	80	79
TGCACATCATAGTGCGACGTTGATCCAGATAGACTATAAGACGGCTTGGCA TTTACCCTAGTCACTATCT (SEQ ID NO: 60)	81	80

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
AATGTGTCAGCGGCCTAACTGTAATTGATCCACACCTTAGTTCGGGAGCTA CCGATCTAATCAACCGTTT (SEQ ID NO: 61)	82	80
AGACTCCAGGTCGATCATTGGATAACCAACCAGTCGGTTATCCATGACGAG TGAATAATCTTACCGCAGG (SEQ ID NO: 62)	82	80
TTTAGATCCTAAGAATGCGAAATGCCGATTCCCGCATATTTTCGTAAGCTCGT TCGGGACTTTGTATCGGC (SEQ ID NO: 63)	82	81
GAGTGATAGGATCACTCTAAGATCGGCCACTATACGACGCTGAGGTTTATA TGAACGGCCGCAATTATGA (SEQ ID NO: 64)	79	81
TCTTGACCAACACCATGTCCGACATACTCCCTAACATGGGTACGGCGACTA CTGAATCGTTCTTTGAGAG (SEQ ID NO: 65)	82	82
TGTGTAAATGAAAGCATCTGACTCAACAGGCATCAGTAACGATAATGAGTA CAACGCCCAATGGTCATAG (SEQ ID NO: 66)	80	79
GCTTCAACGATTTCAATATACCCATTCGTCAGAGGAAGTAGTAGATCCCGC CGTCTTAGTCGGATTGAAA (SEQ ID NO: 67)	79	81
TGTGGTTCCGGTTGCGTATAGATCATGATTCTTACCCACCTCTTGCTGTAA TGACCACAATCAACGTAG (SEQ ID NO: 68)	79	82
GTATCGGCGAACACGAAATCCTCTACTCTTGACAACTCCCATTCTACCTC TCCAAAGTTAGAGGAGAT (SEQ ID NO: 69)	81	80
TTGCATTACAATGGCCGATCAAGATAAGGACATTCATAATGGAGCTATAGA ATACAACACCAACGTCGCA (SEQ ID NO: 70)	79	79
TAATTCTTCCTTGATTCCGTGATTGGATGTCCTCAGGAGTAGTAGTGTGGA TGTTGTTGTTAGACACTT (SEQ ID NO: 71)	79	78
TGGAGGGTCGTAACCGCTATAGATGTGATTCACTCCAACAACCTCCCTATCT TTAATCCTCTCACTCCAC (SEQ ID NO: 72)	81	78

ES 2 887 726 T3

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
TGAATAAAATTCGTTGGCGCTGTAGAGATCGGAGTTCGGATTCTACTACTCGTTTACGGGATTTACAGA (SEQ ID NO: 73)	80	80
GCTAAAGGAGACTCCGGTTTAAACGTCATCGCAATCTTTGATGGGCAAGCGAGCACATAGATATGCGTTA (SEQ ID NO: 74)	81	82
AATATTCTCCGGCATGAATGGCGTGGAATGAATCCGGCTTTGTGTTTATTGTACATAGACGTTGTCCCG (SEQ ID NO: 75)	82	81
GAGAACGAGCGGAGCAAGATAGCCTTTAACTGAATCGTCGTCTTATCCCA GTACACATCATTCCAAATG (SEQ ID NO: 76)	81	79
ATATTCTGTACTCAGTGCCTATCCACCTAATAGGGACCTCAGCGACCTGTCC GTTACATTAATGAAACAT (SEQ ID NO: 77)	78	81
CATTCCGTAGAATTACTACACCGCGGGATCATTATAACGTCGAAGAGCTTCAGAGGTAAGTGAAACAAGG (SEQ ID NO: 78)	79	81
CCCGAAGGCATAATCAACATCCATTGTACATCCCTTGTTATAGCTCCAGGG CCAGAGATTAAAGGAATAG (SEQ ID NO: 79)	81	79
CTAGGATGTAACCTTGCCTTAGTTGCAGATTCGCTATATTGCTTAAGCTCTGAGCTCCATGTCCAGTAATT (SEQ ID NO: 80)	79	79
TTCTCGCAGTTGTAAACTTATAGTGTCGCGCCTAGAAATTCATAGCCACAA ATTCTCTTTGGGCAGAGAT (SEQ ID NO: 81)	81	78
TATAGTTACCAAGTACTATGGGTTGGTGGAAGCCGAACGTCTGTCCAAATG GAGCTATAGTTAAGAGGGA (SEQ ID NO: 82)	80	80
AGACGCACACCGATAGAGGAGAGATCTTACATACCTGCTAAGGTTGTAAAT GGCATTGCAGATAGCTTAG (SEQ ID NO: 83)	81	79
CCAGAAAGGTACAGGGCCAATTAACACGTAATCGGCCTCCAACCTCTGCCAT CTTTAAGCATTCTAAAGCT (SEQ ID NO: 84)	82	80

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
AATTCTCCGTCATGTGGTCGTCTGATGCCTAACTTTATCTGCTATCAATGTA GAGGATCGTGCATTACCG (SEQ ID NO: 85)	82	79
CGCGGGCTAAGTAGTAGGGTTCTAATGCTACTTTAAATACGCTCACAATCC AGGCTATATCGCTGTAGCT (SEQ ID NO: 86)	80	81
TAATCACTGTATTTGTTAATCATGGCTAGGCGGGTCCAATAGGGAACTGA TACTAACGTAGGAGCACGC (SEQ ID NO: 87)	79	81
GTATTCTGGAGAACCTCGTGGCAATGGCAATTCTCCACGAGTGCTAAGATC TGAGCCGTTACCAAAGAG (SEQ ID NO: 88)	82	81
ATAACCTGGTCTCCGGTTGATCGTTTACCTGAAACATGAGATTAGCAACGA CCCAAACATGCCACTTCAC (SEQ ID NO: 89)	81	82
CACAACATGCAGCAGGCAAGTAGGGTTTCTGATTATAAGCATCCAGCAATA AAGCCTCCTTCAAACCAAC (SEQ ID NO: 90)	81	81
CCCTAACCATGTTCTACGAGCGGTCACAGATTATATTCAACTACAAGTGTA AATGTACGAGCGCCGAGAT (SEQ ID NO: 91)	80	80
GAAAGGCATTTGACGGGAGCATTGACGAAGACATACGGTAATTTGTCGTCG CACGGACAATTAGTGAGTT (SEQ ID NO: 92)	82	81
TAATACTGGGTCACAAGATTAGATTCCAGCTGTGACGGCGATGAAGTCCGC GAGGATATGTTTCTATATC (SEQ ID NO: 93)	78	81
GGTTCATTGTCTCATCGTACGGCTAATGTAGATACGAGGTAGCCGAGTATG ACACACCACAGCAGTTAAT (SEQ ID NO: 94)	78	82
TTATGGATTCCGATGATCCTCCGCGTGGTACAAATGTTACCTTGATGCAATA GTCTCTGTATGCGATCGG (SEQ ID NO: 95)	82	80
AGCGGTACTAATATGCTATGAGCGAGTTCCTAACGAGAGATAACGACCCT CTGTCGTAAGCACTTAAGG (SEQ ID NO: 96)	80	81

ES 2 887 726 T3

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
GAGGCATCTCTGCTAACTATATGCTGAACAGCTTTTCCACGATATAGGTAC ATTGGACGCTTACAGGATA (SEQ ID NO: 97)	80	79
TTTCGGCCCAACTTATATGCTCTCCGAATCTTGGAGCAGTCATCGTAACCTG ATAGCAATCTACGTCAAG (SEQ ID NO: 98)	82	80
ACTGCAGTGAGGGCAACCAATACAAATTAATCTGCCTCCTATTGGGATAC CTCCCGTCCATTAAGTTAG (SEQ ID NO: 99)	79	80
TTGGAGAAACAACCATACAGGTGTCTTTAACTACCTGGAACCTCTACCAATT GGAGCTTCTTAGCTGTCT (SEQ ID NO: 100)	78	80
GCTATCAACTTCCCTATCCAAACCGTTGGATGAATTGAAAGCATAGATGTT CCTTGGAGAGGTTTCCCAG (SEQ ID NO: 101)	80	81
TGAGGAGTAAGTATACGACGCCTGCACTAGTCACTTGCTGGCTTTGAGCCA ATAGATGTGTTAATGGCTA (SEQ ID NO: 102)	82	81
CACAGCCAATCTCTTAGGACAGTACATGGTTAGTAACGTCTGTGGAAGTCA TGAGCACACGATCTGTAAG (SEQ ID NO: 103)	79	82
TGAGTATCTACAGGTGTTCTCATGGGATCGTAGTTGGTCTGTCCAACATGAC GTTATAGGCATAACTCCA (SEQ ID NO: 104)	79	81
TACCTTAAACTGCGCTGGTAACTTGGATCGTGTAGTCATTGGGAGCAAACC ATCTGTCTTTCGTATGGAG (SEQ ID NO: 105)	81	81
GTTAGGTTTCAGCCTCATTCCCTAAGAATCCAACCTCATAACTCAATCATGCGC GTCCAGCAAAGACAAATG (SEQ ID NO: 106)	80	81
ACTGTCTAATACAACCGGATTCTAAGACCACATGGTCTTAGACGCGCGTGC AATTCTGAACTATATGATT (SEQ ID NO: 107)	79	79
TGGCTATTGCCGCAGTAGATCAAAGATTGAGAGAGATATAGATTACTCCAT GATACACCCAAGCCTCGAC (SEQ ID NO: 108)	81	79

Secuencia diana	Tm sonda de captura (°C)	Tm sonda informadora (°C)
GCAACAAGTGATGCTGACGCAGTTGTTATAGATGGCCTTTGGCTCACGCTA ATTGAGTTACTGTAGGAAA (SEQ ID NO: 109)	81	80
GCTATCTCACCAGCTCCTCACCATGACATTTACTCTCCACATTTATCTGCGA CCTGTTTCGTAAACGATG (SEQ ID NO: 110)	81	80

La longitud de la secuencia de 70-mero se seleccionó para una hibridación óptima con las sondas de captura e informador NanoString. También se evaluaron otros tamaños. La longitud de la secuencia de acortamiento tiende a mejorar la señal, pero reduce la capacidad de hibridación. Por ejemplo, aunque las secuencias de 50-mero dieron señales relativamente más altas en comparación con los controles, las secuencias de 30-mero no se hibridaron de manera confiable. Por lo tanto, se seleccionaron secuencias de 70-mero para una hibridación confiable. Sin embargo, las secuencias que son más largas o más cortas que 70 nucleótidos también se pueden usar en los métodos descritos en este documento.

Los anticuerpos (por ejemplo, enumerados en la Tabla 1) se pueden comprar de fuentes comerciales, y se purificaron inicialmente a partir de BSA y/u otros contaminantes con una columna de centrifugación Zeba o un filtro centrífugo. Los anticuerpos se incubaron luego con un enlazador bifuncional fotoescindible en PBS (que contenía 5% de N,N'-dimetilformamida y 10% de NaHCO₃ 0.1 M) a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Posteriormente, se eliminaron los reactivos en exceso de los anticuerpos activados con maleimida con una columna de centrifugación Zeba [7000 de peso molecular de corte (MWCO), eluyente: PBS].

Los oligos de ADN modificados con tiol (de Integrated DNA Technologies) se redujeron con ditiotretol (DTT; 100 mM) en PBS (EDTA 1 mM, pH 8.0) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los oligos de ADN reducidos se purificaron luego con una columna NAP-5 (GE Healthcare), con agua desionizada como eluyente. Se descartaron las fracciones que contenían DTT (determinado con el ensayo microBCA). Las fracciones de ADN reducidas restantes se agruparon y se concentraron con un filtro Amicon de 3000 MWCO (Millipore).

Los anticuerpos activados con maleimida se incubaron con los oligos de ADN reducidos en solución de PBS. En un proceso de conjugación típico, se incubó un exceso molar de 15 veces de oligos de ADN con anticuerpos activados con maleimida. La reacción de conjugación se dejó continuar durante 12 horas a 4°C. Los conjugados de código de barras de ADN-anticuerpo se purificaron con un filtro centrífugo Millipore 100K MWCO seguido de tres lavados con PBS. Después de mezclar los anticuerpos, se realizó una purificación final del exceso de ADN con perlas magnéticas recubiertas con proteína A/G (Pierce/Thermo Scientific). El protocolo comercial de Thermo para la separación magnética se modificó solo livianamente para usar una solución salina regulada con tris (TBS)/0.1% de Tween Wash Regulador y un Gentle Ag/Ab Elution Regulador (Thermo Scientific). Se realizaron tres eluciones durante 20 minutos cada una. El anticuerpo disolvente se intercambió en TBS puro con una columna de desalación Zeba (7000 MWCO).

Caracterización de anticuerpos. Los anticuerpos se dividieron en alícuotas y se almacenaron a concentraciones de 0.25 mg/ml en PBS con BSA (0.15 mg/ml) a -20°C, con un uso adecuado de al menos doce operaciones experimentales (el número de operaciones en cada cartucho NanoString) para evitar ciclos de congelación-descongelación. Se probaron varios otros métodos de almacenamiento, incluido el glicerol o el almacenamiento a 4°C, pero la división en alícuotas y la congelación mostraron el almacenamiento más consistente y de alta fidelidad durante hasta 9 meses. Las concentraciones de anticuerpos se determinaron mediante el ensayo microBCA (Thermo Scientific). Las concentraciones de ADN también se determinaron independientemente usando el kit Qubit ssDNA (Invitrogen) para cuantificar el número relativo de ADN por anticuerpo. Para lograr mediciones relativas de ADN/Ab con mayor sensibilidad en la cohorte de anticuerpos, en algunas realizaciones, la plataforma NanoString se usó para agregar cócteles de anticuerpos en dos condiciones: (1) "Control": los anticuerpos se agregaron en sus formas nativas con ADN aún unido y (2) "ADN liberado": los anticuerpos se trataron con proteinasa K y se fotoescindieron. Bajo la condición de control, el ADN todavía estaba unido al anticuerpo y, por lo tanto, no podía unirse simultáneamente al informador del ensayo NanoString y a la sonda de captura. La diferencia en las lecturas de ADN entre estas dos mediciones reveló así el número relativo de ADN por anticuerpo. Esta diferencia se dividió por la medición de control de isotipo para tener en cuenta el posible error experimental inherente en la concentración de proteínas y/o el aislamiento de anticuerpos (véase Figura 6 para el número relativo de relación ADN:Ab). Los anticuerpos fueron rigurosamente probados y validados antes de su uso. De 110 anticuerpos, 88 fueron seleccionados para el panel final y todos habían sido previamente validados por proveedores específicos (principalmente Cell Signaling Technologies,

BioLegend; Tabla 1). Los anticuerpos que no funcionaron con conjugados de ADN tampoco funcionaron en su estado nativo y fueron excluidos; los anticuerpos conjugados con ADN funcionaron tan bien como el anticuerpo original (Figuras 7A-7B).

Tinción de anticuerpos y recolección de ADN para el perfil de proteínas. Antes de la tinción celular, los anticuerpos se agruparon en un cóctel con TBS, 0.1% de Tween y 0.2 mg/ml de cisteína (para evitar la reacción cruzada del ADN con otros anticuerpos). Los tubos se recubrieron con regulador de bloqueo de suero durante la noche para evitar que las muestras se unieran de forma no específica a las paredes del tubo. Luego, las células se incubaron durante un mínimo de una hora con un regulador de bloqueo a 37°C: suero de conejo al 10% v/v (Jackson Immuno Research Labs, 011-000-120), 2% de BSA, 1 mg/ml de esperma de salmón SS ADN (Sigma Aldrich, D7656), 0.2 mg/ml de cisteína (Sigma Aldrich), 20X Perm (BD Bioscience) o 0.1% Tween 20 (Sigma Aldrich), todos en PBS para minimizar la unión de anticuerpos o ADN no específicos. El cóctel de anticuerpos se añadió luego a las células fijas y permeabilizadas y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con mezcla intermitente.

Después de la incubación, las células se lavaron con PW+ con 0.05 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado con DS (Life Technology, AM9680). Se realizaron dos lavados de 15 ml en tubos de 15 ml o cuatro lavados de 1.5 ml en tubos de microcentrífuga de 1.7 ml. Se deseaban pasos de bloqueo y lavado para lograr un fondo bajo incluso con detección femtomolar. Todos los lavados se realizaron en hielo. Las células marcadas podrían contarse y seleccionarse para lisis/proteinasa K/fotoescisión para liberar el ADN. Se usó regulador de lisis en 10 µl de células (con hasta 50.000 células), 34.2 µl de regulador de lisis ATL (Qiagen) y 5.8 µl de proteinasa K (Qiagen). Esta reacción continuó a 56°C durante un mínimo de 30 min. Luego se realizó la fotoescisión utilizando luz de longitud de onda UV larga (modelo) durante 15 min. Esto dio como resultado una mezcla de lisis celular con ADN liberado. Las muestras se centrifugaron a 14.000 × g durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se realizaron diluciones en serie en agua libre de nucleasas (Invitrogen, AM9937) para recoger ADN equivalente a 50-100 células para evitar saturar el cartucho de lectura (Nanosttring). Esta cantidad dio como resultado densidades de unión del cartucho dentro del rango lineal de cuantificación. Las densidades de unión en el rango inferior (0.05 -0.2) todavía eran lineales y dieron perfiles de proteínas consistentes comparables a los del rango más alto (1.5-2.5). A densidades de unión más bajas (por ejemplo, células individuales), se pudo medir la mayoría de los marcadores, con la excepción de los marcadores de baja expresión con anticuerpos más débiles (pJAK2, pChk2).

Inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia proporcionó una medida independiente y cambios de marcadores validados del tratamiento con paclitaxel (Taxol) (Figuras 16A-16B). Las células HT1080 se sembraron a 4.000 células por pozo en placas de 96 pozos (Grenier), que eran compatibles con placas de alta resolución, y se cultivaron durante 24 h en medio DMEM antes de tratarse con Paclitaxel a 100 nM o mantenerse en medio de control. Después de 24 h, las células se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron suavemente en un oscilador con PBS/Tween al 0.1% durante 5 minutos, repetido 3 veces. Todos los lavados posteriores también se realizaron con este regulador, tiempo de duración y protocolo de repetición.

Las células se permeabilizaron luego con metanol helado al 90% durante 20 min. Después del lavado, las células se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con regulador de bloqueo (Odyssey). Los anticuerpos primarios (todos de Cell Signaling; ver Tabla 1) se agregaron luego en regulador de bloqueo a las diluciones prescritas, se sellaron, se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, después del lavado, se agregaron anticuerpos secundarios anti-FITC de conejo, 1:500 Hoechst y 1:200 azul de células enteras (Cellomics) (todos los anticuerpos primarios eran IgG de conejo) a 2 µg/ml y se incubaron durante 2 h. Los pasos finales de lavado se realizaron solo en PBS, y las células se fotografiaron posteriormente a 20X usando un microscopio Olympus (BX63) con una cámara y software Delta Vision. Todas las imágenes fueron tomadas por triplicado biológico. La intensidad de fluorescencia para cada célula se determinó utilizando CellProfiler, que utilizó Hoechst y tinción de células completas para delinear los límites de las células y las restricciones de tamaño para descontar los desechos. Luego se utilizó un código MATLAB (Mathworks) interno adicional para calcular las señales de marcador para cada condición y calcular los cambios entre las células tratadas y las no tratadas.

Inmunotransferencia y transferencia de puntos. Las líneas celulares OVCAR3, SKOV3, CAO3, A2780 y OVCAR429 se sembraron en placas de 6 pozos y se cultivaron durante 72 h antes de la lisis para el análisis de transferencia Western. Las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo, se rascaron en 200 µl por plato de regulador de ensayo de radioinmunoprecipitación (regulador RIPA) (Cell Signaling Technology), que contenía cóctel de inhibidor de fosfatasa y proteasa HALT (Pierce), y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 2 ml. Los lisados se pasaron a través de una jeringa de 23 g 5 veces, y luego se incubaron 5 minutos en hielo con agitación vortical cada minuto. Los lisados se centrifugaron 15 min a 14.000 × g (4°C). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga y se midió la proteína total usando el ensayo BCA. Igual proteína total fue preparada, hervida y cargada en un gel Nove-NuPAGE 4-12% Bis-Tris y luego transferida a nitrocelulosa.

Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en regulador SuperBlock T20 (TBS) (Pierce) y luego se lavaron brevemente en solución salina regulada con tris (TBS) con Tween-20 al 0.1% (TBST). Las membranas fueron incubadas durante la noche a 4°C con oscilación en p53 (1:1000, Cell Signaling), p53 conjugado con ADN (1:1000), pS6RP (1:1000, Cell Signaling), o pS6RP conjugado con DNA (1:1000) anticuerpos primarios diluidos en TBST con 10% de SuperBlock. Las membranas se lavaron tres veces, 5 minutos cada una en TBST y luego se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en anticuerpo secundario conjugado de cabra α-conejo HRP diluido 1:1000

en TBST con 10% de SuperBlock. Después del lavado, se detectó la señal utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce). Para los anticuerpos Ki67, los lisados de células arrastradas (antes de la desnaturalización) de arriba se cargaron en nitrocelulosa en un aparato de microfiltración Bio-Dot (Bio-Rad). Las transferencias se procesaron entonces como anteriormente, usando un Ki67 o un anticuerpo Ki67 conjugado con ADN (1:1000, BD Biosciences) y un anticuerpo secundario conjugado con HRP α -ratón diluido como anteriormente. Las manchas de puntos se detectaron como se hizo anteriormente.

Aislamiento y procesamiento de células individuales. Después de la tinción de anticuerpos, las células individuales se recogieron con un micromanipulador. Las células se tiñeron con Hoechst 3342 (Molecular Probes), se añadieron a un plato abierto de 10 cm y se tomaron imágenes con un microscopio TE2000 (Nikon). Se colocaron células individuales directamente en un tubo de PCR. Se añadieron cinco microlitros de regulador de lisis/proteinasa K (4.5 μ l de regulador ATL y 0.5 μ l de proteinasa K). La lisis/escisión enzimática continuó durante 30 minutos a 56°C antes de la fotoescisión durante 15 minutos. Las sondas de captura e informador (Tecnologías NanoString) se agregaron directamente a este tubo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Análisis de datos: Cálculo de perfiles de expresión proteómica. Los perfiles de expresión de proteínas se extrajeron de los datos en bruto de la siguiente manera. Primero, los recuentos de ADN en bruto se normalizaron mediante la media de los controles positivos internos de NanoString, que explican la eficiencia de la hibridación. Estos recuentos se convirtieron luego en valores de expresión de anticuerpos usando los recuentos relativos de ADN/anticuerpo. A continuación, se resta la señal de fondo promedio de la IgG de control. Por último, se utilizaron genes de limpieza para la normalización que explicaban las variaciones en el número de células. Las señales se normalizaron mediante una proteína de mantenimiento, por ejemplo, β -tubulina. Para los tratamientos con taxol, las señales se normalizaron mediante la media geométrica de histona H3, GAPDH y actina en lugar de tubulina, porque la tubulina es un objetivo primario del taxol. Los datos se transformaron en escala log2 como se indica en los subtítulos.

Análisis de datos: Agrupamiento. Los mapas de calor y los clustergramas se trazaron utilizando MATLAB con una entrada de matriz de valores de expresión de marcador que se calcularon como se detalla anteriormente. Todos los clustergramas mostrados se realizaron como un enlace ponderado y se agruparon utilizando valores de correlación como métrica de distancia. Algunos clustergramas se normalizaron por fila, como se especifica en los subtítulos, para resaltar las diferencias de marcadores entre diferentes pacientes. Si un marcador no era detectable en uno de los pacientes, se eliminó de la matriz o mapa de calor y no se muestra.

Análisis estadístico. Los datos brutos de los recuentos de ADN de NanoString se normalizaron utilizando primero el software de análisis nSolver para tener en cuenta las diferencias de hibridación en el cartucho. Solo los controles positivos A a D en el software NanoString se utilizaron en la normalización. Los recuentos de ADN estaban dentro del rango lineal de detección y cumplían todos los demás criterios de inclusión según lo determinado por el software nSolver (campos de visión máximos, calidad de imagen, etc.). Después de determinar un valor de expresión teniendo en cuenta los genes no específicos de unión a IgG y mantenimiento (recuento celular), los datos se transformaron en log2.

La correlación entre el análisis unicelular y la medición en masa se calculó en GraphPad Prism. Los valores de Spearman r se calcularon sin suponer una distribución normal y consistente. Se calcularon los valores de P de dos lados, donde se identificaron marcadores significativos comparando dos grupos (por ejemplo, tratados versus no tratados) en Prism y realizando pruebas t por pares con un FDR de 0.2 para el error de corrección de prueba múltiple. Los cambios significativos en el marcador y sus valores de P entre las células individuales A431 tratadas con gefitinib y sin tratar se muestran en la Tabla 3 a continuación. Para los mapas de calor, si alguna muestra tenía marcadores por debajo del umbral, se eliminó toda la fila de marcadores (no se usaron valores de datos imputados). Para identificar marcadores diferenciadores entre respondedores y no respondedores, se usó un algoritmo de clasificación hacia adelante secuencial multiclase. Los pacientes fueron clasificados como respondedores o no respondedores con base en datos conocidos. La factibilidad de separación de clase se midió por la distancia Bhattacharya.

Tabla 3: Marcadores significativos entre células individuales A431 con o sin tratamiento con gefitinib. Seis marcadores de 49 marcadores mostraron una diferencia significativa entre las células individuales A431 tratadas con gefitinib frente a las no tratadas y los valores de expresión promedio calculados mediante el perfil de NanoString para cada cohorte. La importancia del marcador se determinó mediante pruebas t por pares y se corrigió para múltiples errores de prueba mediante el uso de una tasa de descubrimiento falso de 0.2.

Proteínas	P	Sin tratamiento	Tratada
Fosfo-S6RP	0.0067212	1171.3	58.4
Fosfo-histona H3	0.0091305	4920.6	982.0
Ku80	0.0098001	770.2	120.6
FGFR4	0.0106319	914.9	114.1
CD56	0.0117795	1906.5	334.4

Proteínas	P	Sin tratamiento	Tratada
Dimetil-histona H3 (Lys36)	0.0119939	695.7	86.9

Referencias

1. M. Basik, A. Aguilar-Mahecha, C. Rousseau, Z. Diaz, S. Tejpar, A. Spatz, C. M. Greenwood, G. Batist, Biopsies: Next-generation biospecimens for tailoring therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10, 437-450 (2013).
- 5 2. B. Vogelstein, N. Patatadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz Jr., K. W. Kinzler, Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546-1558 (2013).
3. J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, V. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson, EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500 (2004).
- 10 4. M. Soda, V. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, V. Vamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, V. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, V. Sohara, V. Sugiyama, H. Mano, Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561-566 (2007).
5. M. B. Vaffe, The scientific drunk and the lamppost: Massive sequencing efforts in cancer discovery and treatment. *Sci. Signal.* 6, pe13 (2013).
- 15 6. E. D. Hsi, A practical approach for evaluating new anticuerpos in the clinical immunohisto-chemistry laboratory. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125, 289-294 (2001).
7. E. J. Lanni, S. S. Rubakhin, J. V. Sweedler, Mass spectrometry imaging and profiling of single cells. *J. Proteomics* 75, 5036-5051 (2012).
- 20 8. S. C. Bendall, E. F. Simonds, P. Qiu, A. D. Amir el, P. O. Krutzik, R. Finck, R. V. Bruggner, R. Melamed, A. Trejo, O.I. Ornatsky, R. S. Balderas, S. K. Plevritis, K. Sachs, D. Pe'er, S. D. Tanner, G. P. Nolan, Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science* 332, 687-696 (2011).
9. S. S. Agasti, M. Liong, V. M. Peterson, H. Lee, R. Weissleder, Photoescindible DNA barcode-antibody conjugates allow sensitive and multiplexed protein analysis in single cells. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 18499-18502 (2012).
10. P. Fortina, S. Surrey, Digital mRNA profiling. *Nat. Biotechnol.* 26, 293-294 (2008).
- 25 11. G. K. Geiss, R. E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, N. Dowidar, D. L. Dunaway, H. P. Fell, S. Ferree, R. D. George, T. Grogan, J. J. James, M. Maysuria, J. D. Mitton, P. Oliveri, J. L. Osborn, T. Peng, A. L. Ratcliffe, P. J. Webster, E. H. Davidson, L. Hood, K. Dimitrov, Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat. Biotechnol.* 26, 317-325 (2008).
- 30 12. J. Chung, D. Issadore, A. Ullal, K. Lee, R. Weissleder, H. Lee, Rare cell isolation and profiling on a hybrid magnetic/size-sorting chip. *Biomicrofluidics* 7, 054107 (2013).
13. S. L. Spencer, S. Gaudet, J. G. Albeck, J. M. Burke, P. K. Sorger, Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459, 428-432 (2009).
- 35 14. J. N. Andersen, S. Sathyanarayanan, A. Di Bacco, A. Chi, T. Zhang, A. H. Chen, B. Dolinski, M. Kraus, B. Roberts, W. Arthur, R. A. Klinghoffer, D. Gargano, L. Li, I. Feldman, B. Lynch, J. Rush, R. C. Hendrickson, P. Blume-Jensen, C. P. Paweletz, Pathway-based identification of biomarkers for targeted therapeutics: Personalized oncology with PI3K pathway inhibitors. *Sci. Transl. Med.* 2, 43ra55 (2010).
- 40 15. S. Shintani, C. Li, M. Mihara, N. Terakado, J. Vano, K. Nakashiro, H. Hamakawa, Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int. J. Cancer* 107, 1030-1037 (2003).
16. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
17. J. Wang, J. V. Zhou, G. S. Wu, Bim protein degradation contributes to cisplatin resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 22384-22392 (2011).
18. C. Benoist, N. Hacohen, Immunology. Flow cytometry, amped up. *Science* 332, 677-678 (2011).
- 45 19. N. McGranahan, R. A. Burrell, D. Endesfelder, M. R. Novelli, C. Swanton, Cancer chromosomal instability: Therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep.* 13, 528-538 (2012).

20. J. Bousquet, J. M. Anto, P. J. Sterk, I. M. Adcock, K. F. Chung, J. Roca, A. Agusti, C. Brightling, A. Cambon-Thomsen, A. Cesario, S. Abdelhak, S. E. Antonarakis, A. Avignon, A. Ballabio, E. Baraldi, A. Baranov, T. Bieber, J. Bockaert, S. Brahmachari, C. Brambilla, J. Bringer, M. Dauzat, I. Ernberg, L. Fabbri, P. Froguel, D. Galas, T. Gojobori, P. Hunter, C. Jorgensen, F. Kauffmann, P. Kourilsky, M. L. Kowalski, D. Lancet, C. L. Pen, J. Mallet, B. Mayosi, J. Mercier, A. Metspalu, J. H. Nadeau, G. Ninot, D. Noble, M. Oztürk, S. Palkonen, C. Préfaut, K. Rabe, E. Renard, R. G. Roberts, B. Samolinski, H. J. Schünemann, H. U. Simon, M. B. Soares, G. Superti-Furga, J. Tegner, S. Verjovski-Almeida, P. Wellstead, O. Wolkenhauer, E. Wouters, R. Balling, A. J. Brookes, D. Charron, C. Pison, Z. Chen, L. Hood, C. Auffray, Systems medicine and integrated care to combat chronic noncommunicable diseases. *Genome Med.* 3, 43 (2011).
- 10 21. E. E. Schadt, Molecular networks as sensors and drivers of common human diseases. *Nature* 461, 218-223 (2009).
22. M. J. Gerdes, C. J. Sevinsky, A. Sood, S. Adak, M. O. Bello, A. Bordwell, A. Can, A. Corwin, S. Dinn, R. J. Filkins, D. Hollman, V. Kamath, S. Kaanumalle, K. Kenny, M. Larsen, M. Lazare, Q. Li, C. Lowes, C. C. McCulloch, E. McDonough, M. C. Montalto, Z. Pang, J. Rittscher, A. Santamaria-Pang, B. D. Sarachan, M. L. Seel, A. Seppo, K. Shaikh, Y. Sui, J. Zhang, F. Ginty, Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 11982-11987 (2013).
- 15 23. F. Janku, J. J. Wheler, S. N. Westin, S. L. Moulder, A. Naing, A. M. Tsimberidou, S. Fu, G. S. Falchook, D. S. Hong, I. Garrido-Laguna, R. Luthra, J. J. Lee, K. H. Lu, R. Kurzrock, PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *J. Clin. Oncol.* 30, 777-782 (2012).
- 20 24. M. Elkabets, S. Vora, D. Juric, N. Morse, M. Mino-Kenudson, T. Muranen, J. Tao, A. B. Campos, J. Rodon, Y. H. Ibrahim, V. Serra, V. Rodrik-Outmezguine, S. Hazra, S. Singh, P. Kim, C. Quadri, M. Liu, A. Huang, N. Rosen, J. A. Engelman, M. Scaltriti, J. Baselga, mTORC1 inhibition is required for sensitivity to PI3K p110a inhibitors in PIK3CA-mutant breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 5, 196ra99 (2013).
- 25 25. K. K. Zorn, A. A. Jazaeri, C. S. Awtrey, G. J. Gardner, S. C. Mok, J. Boyd, M. J. Birrer, Choice of normal ovarian control influences determination of differentially expressed genes in ovarian cancer expression profiling studies. *Clin. Cancer Res.* 9, 4811-4818 (2003).
26. N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 7013-7016 (2009).

Listado de secuencias

- 30 <110> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
- <120> MÉTODOS, KITS, Y SISTEMAS PARA LA DETECCIÓN MULTIPLEXADA DE MOLÉCULAS DIANA Y SUS USOS
- <130> 030258-078413-PCT
- <140> PCT/US14/40731
- <141> 2014-06-03
- 35 <150> 61/972,940
- <151> 2014-03-31
- <150> 61/912,054
- <151> 2013-12-05
- <150> 61/834,111
- 40 <151> 2013-06-12
- <160> 110
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 70
- 45 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 1
- gctaagtttg gaattaagaa aggagttgct ggaggtcctt tccagcataa gaaccagcca 60
- 50 tattgcttaa 70
- <210> 2
- <211> 70
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 2

	tgccttctga aagagacggt attgttgaag caagagatag cttagtaaca aatgctatag	60
	ctcaggcagg	70
	<210> 3	
	<211> 70	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
	cctgatcatg ctttgtcagc agaccagaa gaattcatca caatcactgg aagattgagc	60
	ttaggaaagt	70
10	<210> 4	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 4	
	gagcggatgt tattgagaag cactttacct tagatttcta aagctctctt cctcctctct	60
	tctccgctca	70
	<210> 5	
	<211> 70	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 5	
	atcggctgtg cgattgctat tgatgtgtta agaaatttgg tttgtgattg gcaaattctct	60
25	cctccaactc	70
	<210> 6	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 6	
	atttggatga agtcggcttt atggtgacac aaatcatgat gagctgaggt tctgacagca	60
	aatacgtca	70
	<210> 7	
35	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 7	
	atagaacccat ttgctgatga ggtgacaaca gatcgttgca cttatgctat cccgttagac	60
	tatctgctat	70
	<210> 8	
	<211> 70	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
	actaccatgt actgcgcgag actagcctat cattggattg cagcgatgac tataatctgag	60
50	cacctgtgac	70
	<210> 9	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	

	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
	atatgagacg actagcacgc catagcgta catacgtgtc gatccgagaa catcactcta	60
	atgacgagtg	70
5	<210> 10	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 10	
	catcatcgac agttcgcagc cctataacat gatactagat aacgatgctc catgttagtg	60
	aatgcgagtc	70
	<210> 11	
	<211> 70	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
	actcacacat agtactgaca cgtaagatag gatgctatat ggtcattggt caccgagtt	60
	acgatcaaat	70
20	<210> 12	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
	cagatagact cacctcgata tacagggagc cagcacttag gactatggat aagtcactcta	60
	aagcgtccga	70
	<210> 13	
	<211> 70	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 13	
	cactgtctat acatggacga cactttgcac atcattacca aagagcgcaa cgtatctagg	60
35	attgagcagt	70
	<210> 14	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 14	
	agactaattg atcggaccga tgacagttca cagagggata cactgttgag ccgaccctat	60
	tagctgatat	70
45	<210> 15	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 15	
	tgatccacac tgacgaatca tgtactcact cgatcgccac ttcacacaag aacacaaatt	60
	tggagtattg	70
	<210> 16	

	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 16	
	ctcgagaatc acacacagtc gtctaagaca cgacaagtgc aacagcaatc cacatcttag	60
	atgagatttag	70
	<210> 17	
	<211> 70	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
	cgattacaag gcgtgggtcag atattagact ccaggggatt taatgccagt ccaagctctc	60
	ttccacattc	70
15	<210> 18	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
	atctgcatga acgggaaagg agttcgatga gactttcaaa ccaacataat gtctctccaa	60
	cctcaggaag	70
	<210> 19	
25	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
30	<400> 19	
	atagtcttta gagcctcaga ataggctgtg acgcggaaga taactcataa gtgcctccct	60
	cggtaatattg	70
	<210> 20	
	<211> 70	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 20	
	gccaggtatg ccgtgaacga gttcttcatt aactgttatg tctcgggagt ctgatattgg	60
	tacttctccc	70
40	<210> 21	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 21	
	ttagcaccga tatcaatact gatgatgtca ccgtcgagct cgtgttgaac ccttcaagta	60
	acaacctgac	70
	<210> 22	
	<211> 70	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 22	

	acttggttoga ctgacagttt aacgcctgac atgaacggct tgcttataat gactggcagg	60
	gttatgaatg	70
	<210> 23	
	<211> 70	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 23	
	aaactgaccg taccgtaga agagagttcc gcttctctca tgatgtgcgc atctcccaca	60
	ttatttgacc	70
10	<210> 24	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 24	
	tgatgacagt gacaattgac cgaattgcct gatcattacc ttacagtgcg cagattggga	60
	taatcgattt	70
	<210> 25	
	<211> 70	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 25	
	taggcgttga ggctttgttt ctttgcctct attgtaagac tcattctgac ggcctctagt	60
25	cgttgatatg	70
	<210> 26	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 26	
	aaggacattc tttcgaatgc aagttcaagg cacattttct atatcagcca ccatgggagt	60
	gacattttctt	70
35	<210> 27	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 27	
	caatagctcc agtagtaatt gttgtcgctc cgctgagcag ttaatcctta tgtcaacaac	60
	ctcagcatag	70
	<210> 28	
	<211> 70	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 28	
	ttcaccaagc tgaacagggt tgcgctgaat aaattttaca ggatactatg gacaggttca	60
50	gaatcctcga	70
	<210> 29	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 29		
	ggaatgaatc cattgcattt ccatgagaat gcagacttaa tcggacgtat cgactttggg	60	
	tccacgatat	70	
5	<210> 30		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 30		
	gaggtcttgt ttcactctaaa ccgagcagga tgataagcca taattcgtta cccgagggt	60	
	taattcgtta	70	
	<210> 31		
	<211> 70		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 31		
	gtccttctgc ttatgacatt ccgtgcattc cgtagctacg tcaagcgta catagtgcg	60	
20	gaactgttag	70	
	<210> 32		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 32		
	tctgtacctt ggcactccat ctggttaagtc acttatagtt gtatggtttc agatgaggga	60	
	acgtgtagga	70	
	<210> 33		
30	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
35	<400> 33		
	aatttctgag attgttggtg gagggagaaa tgggaaggac atgtttcaac aatcaccgga	60	
	ttaaagcctt	70	
	<210> 34		
	<211> 70		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 34		
	tgtggaagga ctgtgataaa ccaatagggt gtcaagatct gtaagtatgg gattagggat	60	
	gttctgccag	70	
45	<210> 35		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
50	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 35		
	gccgtcggac ataaccactt ggatatatac gtagtctcatc aaccttaact ccctctgggt	60	
	tcattgggag	70	

	<210> 36	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 36	
	gctattgcag caaagagAAC agacgcttta actggtatcg agcgcttaga tggctatatg	60
	gtctactaga	70
10	<210> 37	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<400> 37	
	gaaatcagat cagttctaca ttcggtggga gccctctata tgattagatc ctgcagccgt	60
	acttccgtca	70
	<210> 38	
	<211> 70	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 38	
	ggtggcttga tttaaactgaa tcaggcccta accatttgta ttgtgtctac actggtccgt	60
	tcttagacgc	70
25	<210> 39	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 39	
	gttggtttacc ttgtagatcg acttcacatc agcggcagaa ggccctcaac gtaaactctgc	60
	tccacattta	70
	<210> 40	
	<211> 70	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 40	
	tgttgacatc cgcaacaatg taccttatat cggcatatgg atctcttgat cgagcgaacc	60
40	tccctttaac	70
	<210> 41	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 41	
	aaggtgattc actaaccagc tcttactcct cgttcggtag caaatgaaat gccggatgct	60
	gttgaagtag	70
50	<210> 42	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
55	<400> 42	

	cgcataactc gaaccacagt tactatcagt cgacatccca ccagagaaat tgaaggatat	60
	tgttgaagca	70
	<210> 43	
	<211> 70	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 43	
	gaatcttgga aggtttccag ttaaataagg cgtgcgaaga ttccaggcag atttctcagg	60
	aattcagtca	70
10	<210> 44	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 44	
	ctgctaatagc tgatggccca ctttctctat ttgtcgccat tatatgcgtt gaggttagtt	60
	caagcaatac	70
	<210> 45	
	<211> 70	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 45	
	gaacagcttt ctttgctccc tctaaatcac catttccatt agatgaaacc gacttcattc	60
25	cagactcaat	70
	<210> 46	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 46	
	aatgcatttg ccaatgtagc cattgtataa ccagatacac tagtccaatg tctcaaccag	60
	ggataccaca	70
35	<210> 47	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 47	
	ctcagagctt caaatctatc ctctggaatc tctgtataag ccctcgaata caacttgagg	60
	tatcccgcac	70
	<210> 48	
	<211> 70	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 48	
	ctcttctgcc ctacatcact atcgactata gcaacatc tttctcgggt aaagattagg	60
	cgtccgatat	70
50	<210> 49	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 49		
5	gtaaccgtag tcgcgcaaac cggtatatta cggatatgat ccaagttata tacattagga	60	
	cgcggttgct	70	
	<210> 50		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
10	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 50		
	atggttagta aacagctttg atttctacat cgcctagca aacccatagt tctgcagtag	60	
	attcacagcg	70	
15	<210> 51		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 51		
	ttcagttata atgtgtccag cagaagcagg aattgaatta cccaagttgc aagtggaaga	60	
	tttgagatta	70	
	<210> 52		
	<211> 70		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 52		
	ttgcagaagc attccaata tgggtttcaa gagtttaaag aatgtggaac attcatggga	60	
	actggtgaag	70	
30	<210> 53		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
35	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 53		
	gcaacaacct catctatact gtgaatagtc cctccgctgt ctatattgga actgctgcaa	60	
	tggttgctct	70	
	<210> 54		
	<211> 70		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 54		
	ccgcagatta tcgtttacga tgcattccatg gtctccgacc cattgagaga gccaatggaa	60	
45	ttaagaactt	70	
	<210> 55		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 55		
	caccattcag cctgatattg cgtttggtgt tgatgtggca actgcatact gaataactcc	60	
	ctgaaatagc	70	
	<210> 56		

	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 56	
	cgttacatac tcagccatag gcttcgataa cagcattatt ggaacctctg ggacattaac	60
	agagacaaca	70
	<210> 57	
	<211> 70	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 57	
	agcgtactag gcatctattg gctgaactac catgtaatta gtgggtgtcc agcctctaag	60
15	atgatgtggt	70
	<210> 58	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 58	
	gataggatgc gactgcgtat catataggct gcacattagc tgttgcttca aatgccaatc	60
	ttacctcaac	70
	<210> 59	
25	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
30	<400> 59	
	aatgtatgag cggacactat gctaagagag actccatcaa tccctctatg caagataaca	60
	acatctggct	70
	<210> 60	
	<211> 70	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 60	
	tgcacatcat agtgcgacgt tgatccagat agactataag acggcttggc atttacccta	60
	gtcactatct	70
40	<210> 61	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 61	
	aatgtgtcag cggcctaact gtaattgatc cacaccttag ttcgggagct accgatctaa	60
	tcaaccgttt	70
	<210> 62	
	<211> 70	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 62	

	agactccagg tcgatcattg gataaccaac cagtcgggta tccatgacga gtgaataatc	60
	ttaccgcagg	70
	<210> 63	
	<211> 70	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 63	
	tttagatcct aagaatgcga aatgccgatt cccgcatatt tcgtaagctc gttcgggact	60
	ttgtatcggc	70
10	<210> 64	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 64	
	gagtgatagg atcactctaa gatcgccac tatacgacgc tgaggtttat atgaacggcc	60
	gcaattatga	70
	<210> 65	
	<211> 70	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 65	
	tcttgaccaa caccatgtcc gacatactcc ctaacatggg tacggcgact actgaatcgt	60
25	tctttgagag	70
	<210> 66	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 66	
	tgtgtaatg aaagcatctg actcaacagg catcagtaac gataatgagt acaacgcca	60
	atggtcatag	70
	<210> 67	
35	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 67	
	gcttcaacga tttcaatata ccattcgtc agaggaagta gtagatcccg ccgtcttagt	60
	cggattgaaa	70
	<210> 68	
	<211> 70	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 68	
	tgtggttccg gttgcgtata gatcatgatt ctttaccac ctcttgctgt aatgaccaca	60
	atcaacgtag	70
50	<210> 69	
	<211> 70	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 69	
	gtatcggcga acacgaaatc ctctactctt gacaaactcc cattcctacc tctccaaagt	60
5	tagaggagat	70
	<210> 70	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 70	
	ttgcattaca atggccgatac aagataagga cattcataat ggagctatag aatacaacac	60
	caacgtcgcga	70
15	<210> 71	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 71	
	taattcttcc ttgattccgt gattggatgt ccctcaggag tagtagtggtg gatgtgtgtg	60
	ttagacactt	70
	<210> 72	
	<211> 70	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 72	
	tggagggtcg taaccgctat agatgtgatt cactccaaca acttcctat ctttaactct	60
30	ctcactccac	70
	<210> 73	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 73	
	tgaataaatt cggtggcgct gtagagatcg gagttccgga ttcgtactac tcggttacgg	60
	gatttacaga	70
	<210> 74	
40	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
45	<400> 74	
	gctaaaggag actccggttt aaacgtcatc gcaatctttg atgggcaagc gagcacatag	60
	atatgcgtta	70
	<210> 75	
	<211> 70	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 75	
	aatattctcc ggcatgaatg gcgtgggaat gaatccggct ttgtgtttat tgtacataga	60
	cggtgtcccg	70
55	<210> 76	

	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 76	
	gagaacgagc ggagcaagat agcctttaac tgaatcgctg tcttattccc agtacacatc	60
	attccaaatg	70
	<210> 77	
	<211> 70	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 77	
	atattctgta ctcagtgcct atccacctaa tagggacctc agcgacctgt ccgttacatt	60
15	aatgaaacat	70
	<210> 78	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 78	
	cattccgtag aattactaca ccgcgggatc attataacgt cgaagagctt cagaggtaag	60
	tgaacaagg	70
	<210> 79	
25	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
30	<400> 79	
	cccgaaggca taatcaacat ccattgtaca tcccttgta tagctccagg gccagagatt	60
	aaaggaatag	70
	<210> 80	
	<211> 70	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 80	
	ctaggatgta acttgcgta gttgcagatt cgctatattg cttaagctct gagctccatg	60
	tccagtaatt	70
40	<210> 81	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 81	
	ttctcgcagt tgtaaaactta tagtgtcgcg cctagaaatt catagccaca aattctcttt	60
	gggcagagat	70
	<210> 82	
	<211> 70	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 82	

	tatagttacc aagtactatg ggttggtgga agccgaacgt ctgtccaaat ggagctatag	60
	ttaagaggga	70
	<210> 83	
	<211> 70	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 83	
	agacgcacac cgatagagga gagatcttac atacctgcta aggttgtaa tggcattgca	60
	gatagcttag	70
10	<210> 84	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 84	
	ccagaaaggt acagggccaa ttaacacgta atcggcctcc aactctgcca tctttaagca	60
	ttctaaagct	70
	<210> 85	
	<211> 70	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 85	
	aattctccgt catgtggctg tctgatgcct aactttatct gctatcaatg tagaggatcg	60
25	tgcattaccg	70
	<210> 86	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 86	
	cgcgggctaa gtagtagggt tctaattgcta ctttaaatac gtcacaatc caggctatat	60
	cgctgtagct	70
35	<210> 87	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 87	
	taatcactgt atttgtaaat catggctagg cgggtccaat agggaaactg atactaacgt	60
	aggagcacgc	70
	<210> 88	
	<211> 70	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 88	
	gtattctgga gaacctcgtg gcaatggcaa ttctccacga gtgctaagat ctgagccgtt	60
	taccaaagag	70
50	<210> 89	
	<211> 70	
	<212> ADN	

ES 2 887 726 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 89	
	ataacctggt ctccggttga tcgtttacct gaaacatgag attagcaacg acccaaacat	60
5	gccacttcac	70
	<210> 90	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 90	
	cacaacatgc agcaggcaag tagggtttct gattataagc atccagcaat aaagcctcct	60
	tcaaaccaac	70
	<210> 91	
15	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
20	<400> 91	
	ccctaaccat gttctacgag cggtcacaga ttatattcaa ctacaagtgt aatgtacga	60
	gcgccgagat	70
	<210> 92	
	<211> 70	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 92	
	gaaaggcatt tgacgggagc attgacgaag acatacggta atttgtcgtc gcacggacaa	60
30	ttagtgagtt	70
	<210> 93	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 93	
	taatactggg tcacaagatt agattccagc tgtgacggcg atgaagtccg cgaggatatg	60
	tttctatatac	70
	<210> 94	
40	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
45	<400> 94	
	ggttcattgt ctcatcgtag ggctaagtga gatacgaggt agccgagtat gacacaccac	60
	agcagttaat	70
	<210> 95	
	<211> 70	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 95	
	ttatggattc cgatgatcct ccgcgtggta caaatgttac cttgatgcaa tagtctctgt	60
	atgcgatcgg	70
55	<210> 96	

	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 96	
	agcggtaacta atatgctatg agcgagttcc ctaacgagag ataacgaccc tctgtcgtaa	60
	gcacttaagg	70
	<210> 97	
	<211> 70	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 97	
	gaggcatctc tgctaactat atgctgaaca gcttttccac gatataggta cattggacgc	60
15	ttacaggata	70
	<210> 98	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 98	
	tttcggccca acttatatgc tctccgaatc ttggagcagt catcgtaacc tgatagcaat	60
	ctacgtcaag	70
	<210> 99	
25	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
30	<400> 99	
	actgcagtga gggcaaccaa tacaaattaa atctgcctcc tattgggata cctcccgtec	60
	attaagttag	70
	<210> 100	
	<211> 70	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 100	
	ttggagaaac aaccatacag gtgtctttaa ctacctggaa ctctaccaat tggagctttc	60
	ttagctgtct	70
40	<210> 101	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 101	
	gctatcaact tccctatcca aaccgttggga tgaattgaaa gcatagatgt tccttgagaga	60
	ggtttcccag	70
	<210> 102	
	<211> 70	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 102	

	tgaggagtaa gtatacgacg cctgcactag tcacttgctg gctttgagcc aatagatgtg	60
	ttaatggcta	70
	<210> 103	
	<211> 70	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 103	
	cacagccaat ctcttaggac agtacatggt tagtaacgtc tgtggaagtc atgagcacac	60
	gatctgtaag	70
10	<210> 104	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 104	
	tgagtatcta caggtgttct catgggatcg tagttgggtct gtccaacatg acgttatagg	60
	cataactcca	70
	<210> 105	
	<211> 70	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 105	
	taccttaaac tgcgctggta acttggatcg tgtagtcatt gggagcaaac catctgtctt	60
25	tcgtatggag	70
	<210> 106	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 106	
	gttaggttca gcctcattcc ctaagaatcc aactcataac tcaatcatgc gcgtccagca	60
	aagacaaatg	70
35	<210> 107	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 107	
	actgtctaata acaaccggat tctaagacca catgggtctta gacgcgcgtg caattctgaa	60
	ctatatgatt	70
	<210> 108	
	<211> 70	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 108	
	tggctattgc cgcagtagat caaagattga gagagatata gattactcca tgatacacc	60
	aagcctcgac	70
50	<210> 109	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 109		
	gcaacaagtg atgctgacgc agttgttata gatggccttt ggctcacgct aattgagtta	60	
	ctgtaggaaa	70	
5	<210> 110		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
10	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 110		
	gctatctcac cagctcctca ccatgacatt tactctcac atttatctgc gacctgttcc	60	
	gtaaacgatg	70	

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra que comprende:
 - a. poner en contacto una muestra con una composición que comprende una pluralidad de sondas diana, en donde cada sonda diana en la pluralidad comprende:
 - 5 i) una molécula de unión a la diana que se une específicamente a una molécula diana distinta en la muestra;
 - ii) una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y
 - iii) un enlazador escindible entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación;
 - b. separar las sondas diana no unidas de una pluralidad de complejos en la muestra, teniendo cada complejo una molécula diana y una sola sonda diana unida a la misma, en donde el complejo no tiene una segunda sonda diana
 10 que se una a una región diferente de la molécula diana;
 - c. liberar las secuencias de nucleótidos de identificación de la pluralidad de complejos;
 - d. acoplar las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas de la etapa de liberación (c) a una composición de detección que comprende una pluralidad de sondas informadoras, en donde cada sonda informadora en la pluralidad comprende: una primera región diana específica de la sonda que es capaz de unir una primera porción de la secuencia
 15 de nucleótidos de identificación; y una etiqueta detectable que identifica la sonda informadora, en la que la etiqueta crea una señal distinguible única para cada sonda informadora, y
 - e. detectar señales de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas basadas en un método de electroforesis sin gel sin ningún paso de amplificación, en donde las señales son distinguibles para las secuencias de nucleótidos de identificación, identificando así las moléculas de unión a dianas correspondientes y detectando una
 20 pluralidad de moléculas diana diferentes en la muestra, y
- en donde la composición comprende además una pluralidad de sondas de control, en donde cada sonda de control en la pluralidad comprende una molécula de unión de control que se une específicamente a una molécula de control en la muestra; una secuencia de control de identificación que identifica la molécula de unión de control; y un enlazador escindible entre la molécula de unión de control y la secuencia de control de identificación.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además cuantificar las señales normalizando las señales asociadas con las sondas diana por las señales asociadas con las sondas de control.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la molécula de unión a la diana es un anticuerpo.
4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la molécula de unión a la diana es un ácido nucleico.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición de detección comprende además una pluralidad de sondas de captura, en donde cada sonda comprende (i) una segunda región específica de la sonda
 30 diana que es capaz de unirse a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y (ii) una etiqueta de afinidad.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la etiqueta de afinidad de la sonda de captura permite la inmovilización de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas sobre una superficie de sustrato sólido, tras el acoplamiento a la composición de detección.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en donde el sustrato sólido se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo para microfluidos, un cartucho, una placa de microtitulación, un tubo y una matriz.
8. El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la inmovilización de las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas proporciona señales espaciales distinguibles que identifican las sondas de captura acopladas a las secuencias de nucleótidos de identificación liberadas.
- 40 9. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el enlazador escindible es un enlazador escindible, no hibridable.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el enlazador escindible, no hibridable, es sensible a una enzima, pH, temperatura, luz, tensión de cizallamiento, sonicación, un agente químico o cualquier combinación de los mismos.
- 45 11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el enlazador escindible, no hibridable, comprende un enlazador fotoescindible.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la liberación de la secuencia de nucleótidos de identificación de las sondas diana unidas comprende exponer las sondas diana unidas a luz ultravioleta.

13. Un kit para la detección multiplexada de una pluralidad de moléculas diana diferentes de una muestra que comprende:
 - a. una pluralidad de sondas diana, en donde cada sonda diana en la pluralidad comprende:
 - i. una molécula de unión a la diana que se une específicamente a una molécula diana distinta en la muestra;
 - 5 ii. una secuencia de nucleótidos de identificación que identifica la molécula de unión a la diana; y
 - iii. un enlazador escindible, no hibridable entre la molécula de unión a la diana y la secuencia de nucleótidos de identificación;
 - b. una pluralidad de sondas informadoras, en donde cada sonda informadora comprende:
 - 10 i. una primera región específica de la sonda diana que es capaz de unirse a una primera porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y
 - ii. una etiqueta detectable que identifica la sonda informadora; y
 - c. una pluralidad de sondas de captura, en donde cada sonda de captura comprende:
 - i. una segunda región específica de la sonda diana que es capaz de unirse a una segunda porción de la secuencia de nucleótidos de identificación; y
 - 15 ii. una etiqueta de afinidad para la inmovilización de la secuencia de nucleótidos de identificación a un sustrato sólido.
14. El kit de la reivindicación 13, en donde la molécula de unión a la diana es un anticuerpo.
15. El kit de la reivindicación 13, en donde la molécula de unión a la diana es un ácido nucleico.

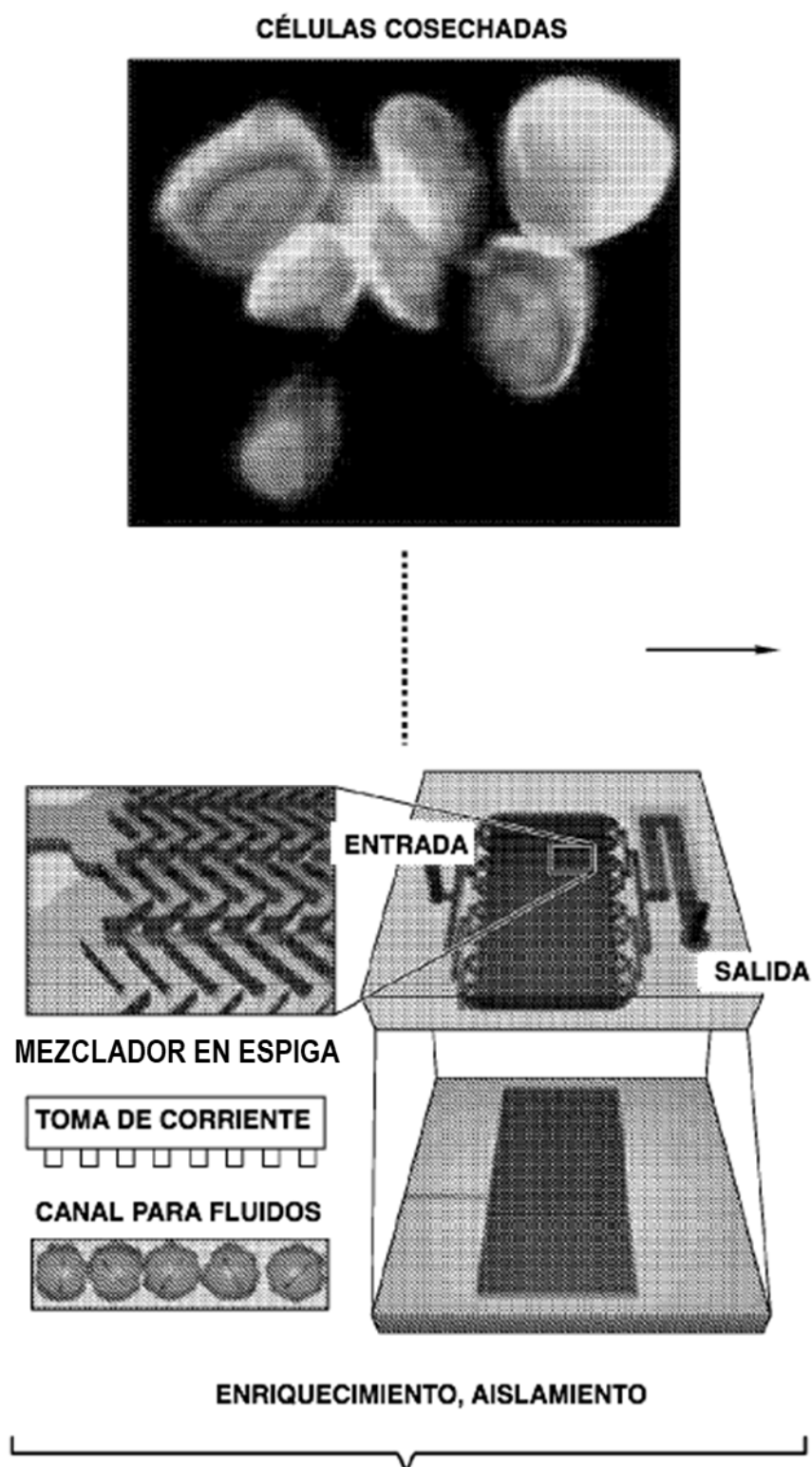


FIG. 1A

ANTICUERPOS CON CÓDIGO DE BARRAS

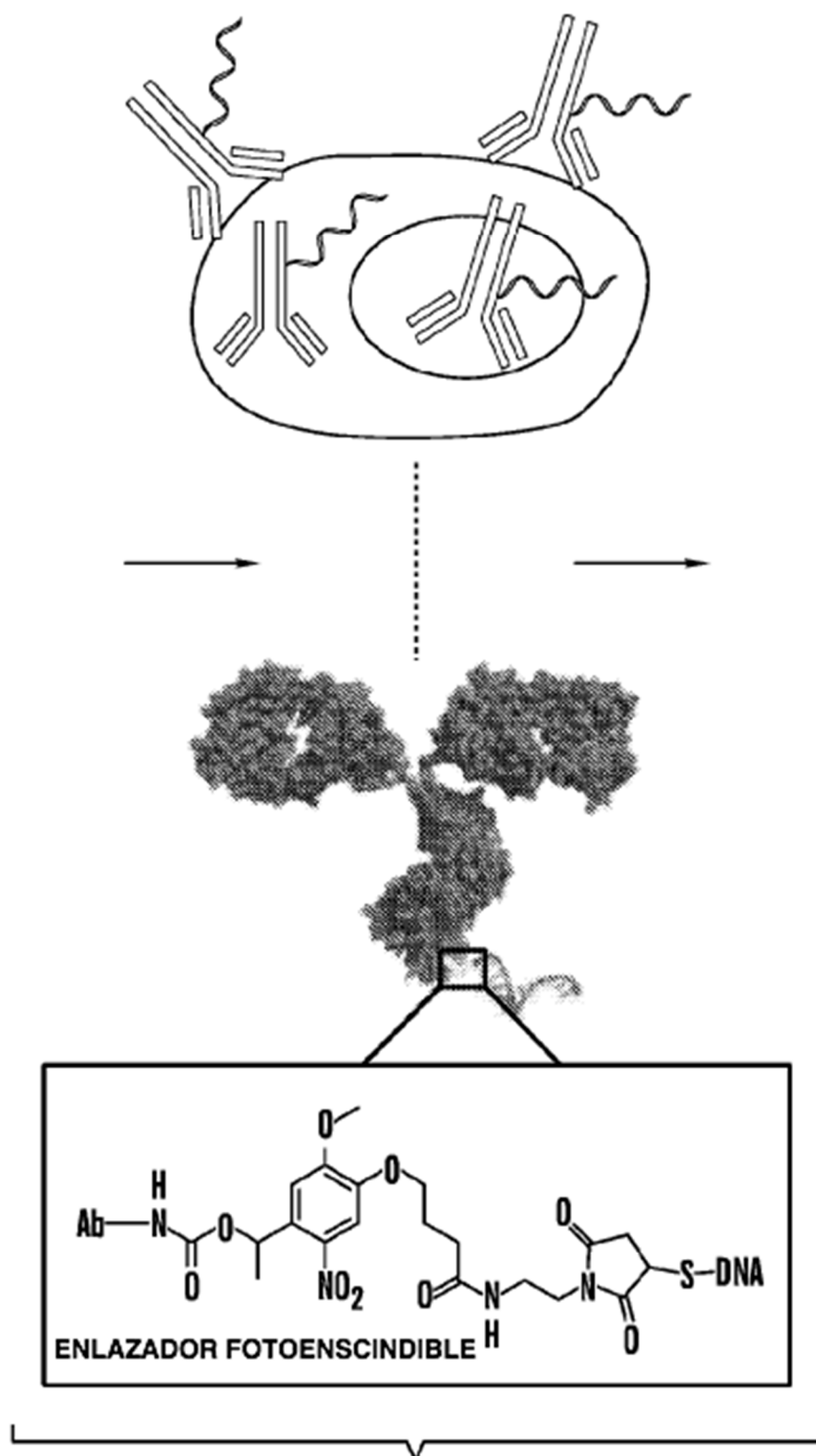


FIG. 1B

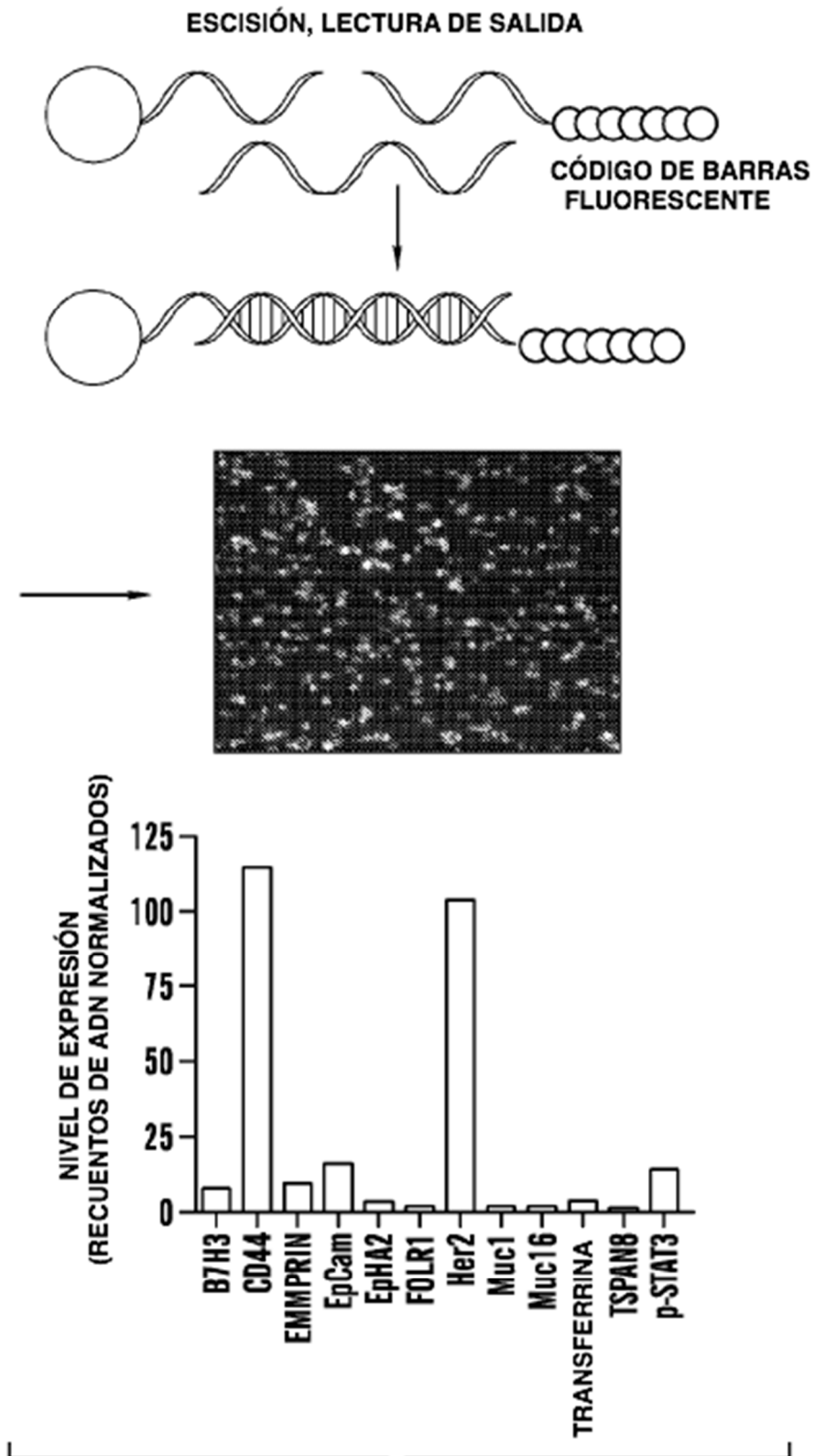


FIG. 1C

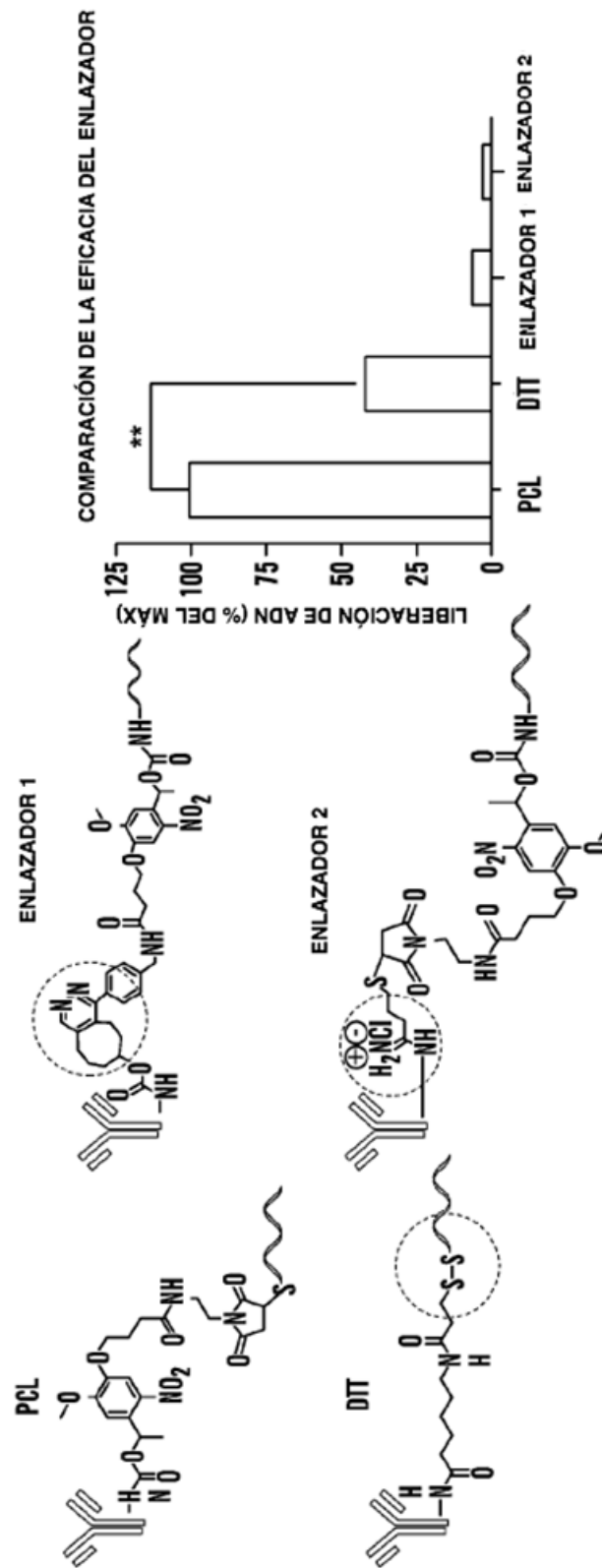


FIG. 2A

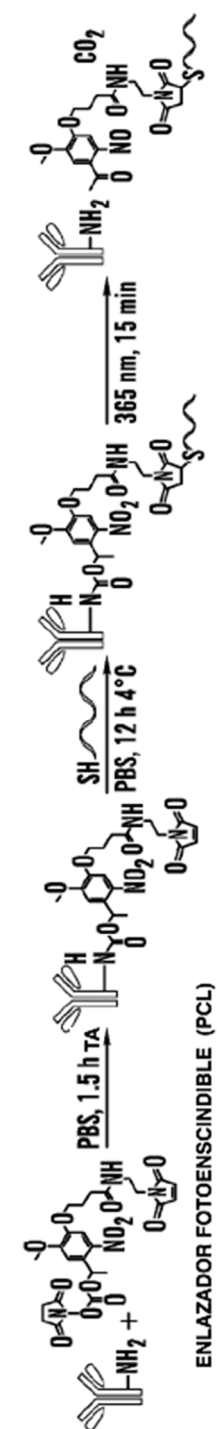


FIG. 2B

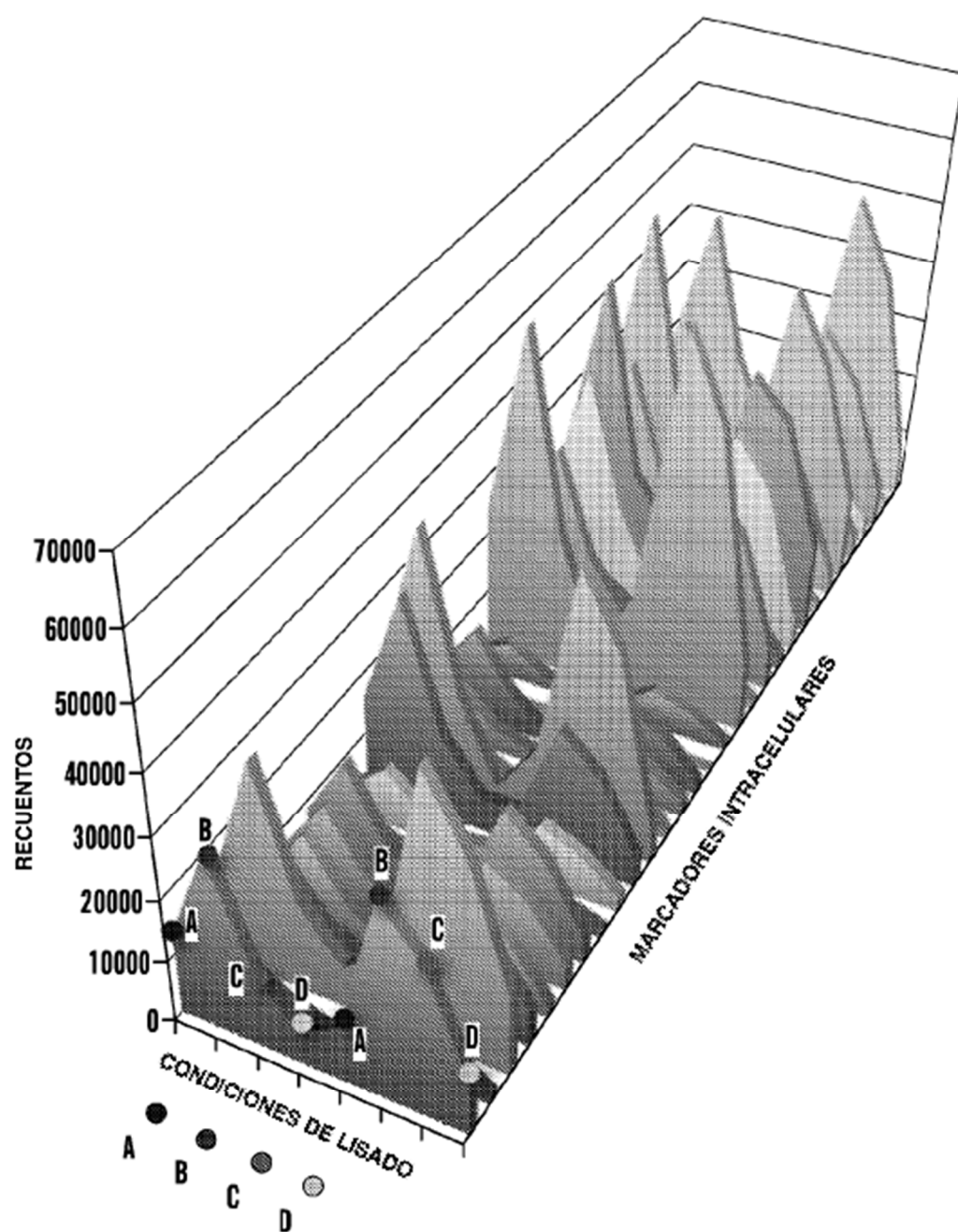


FIG. 3

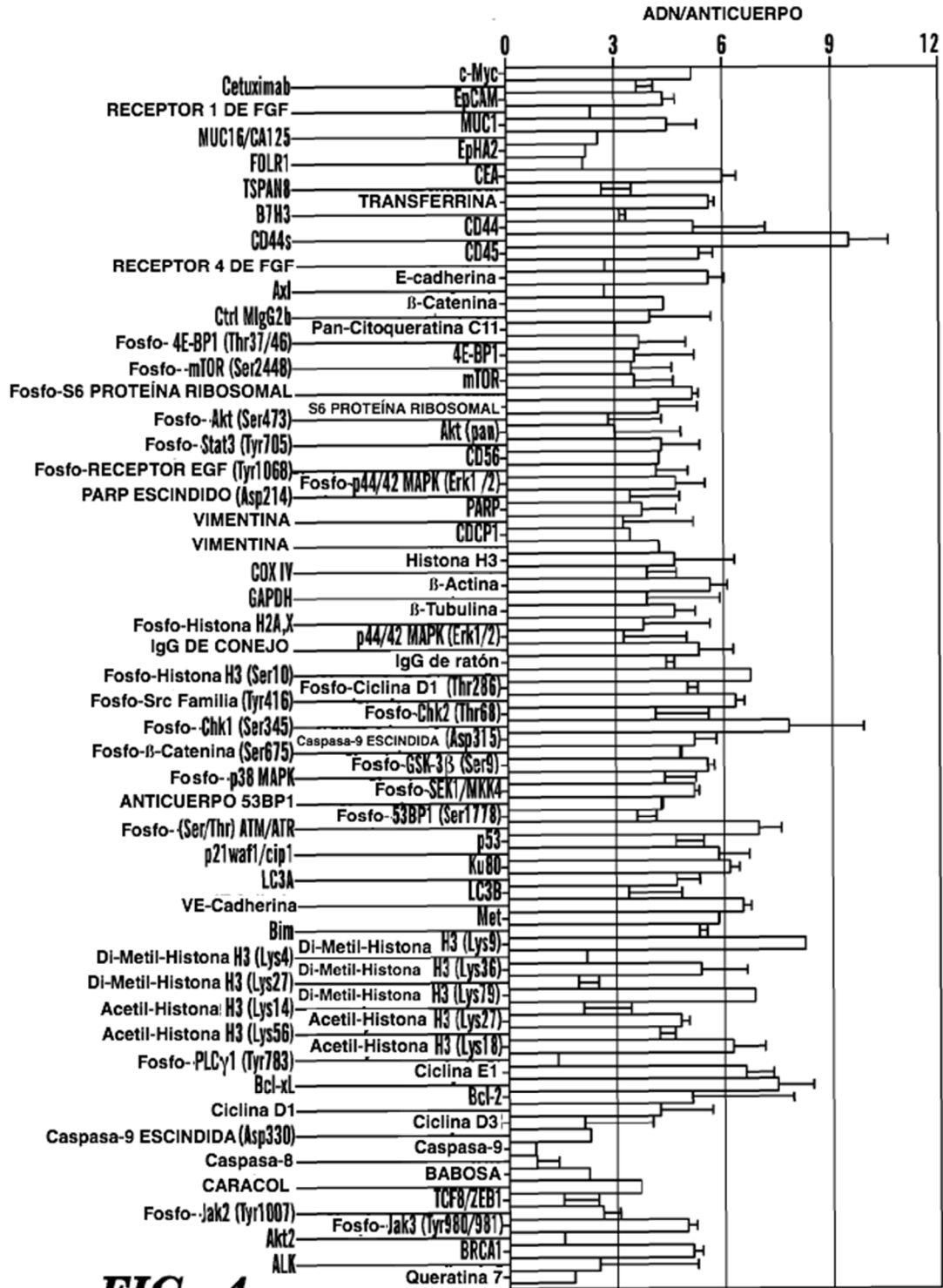
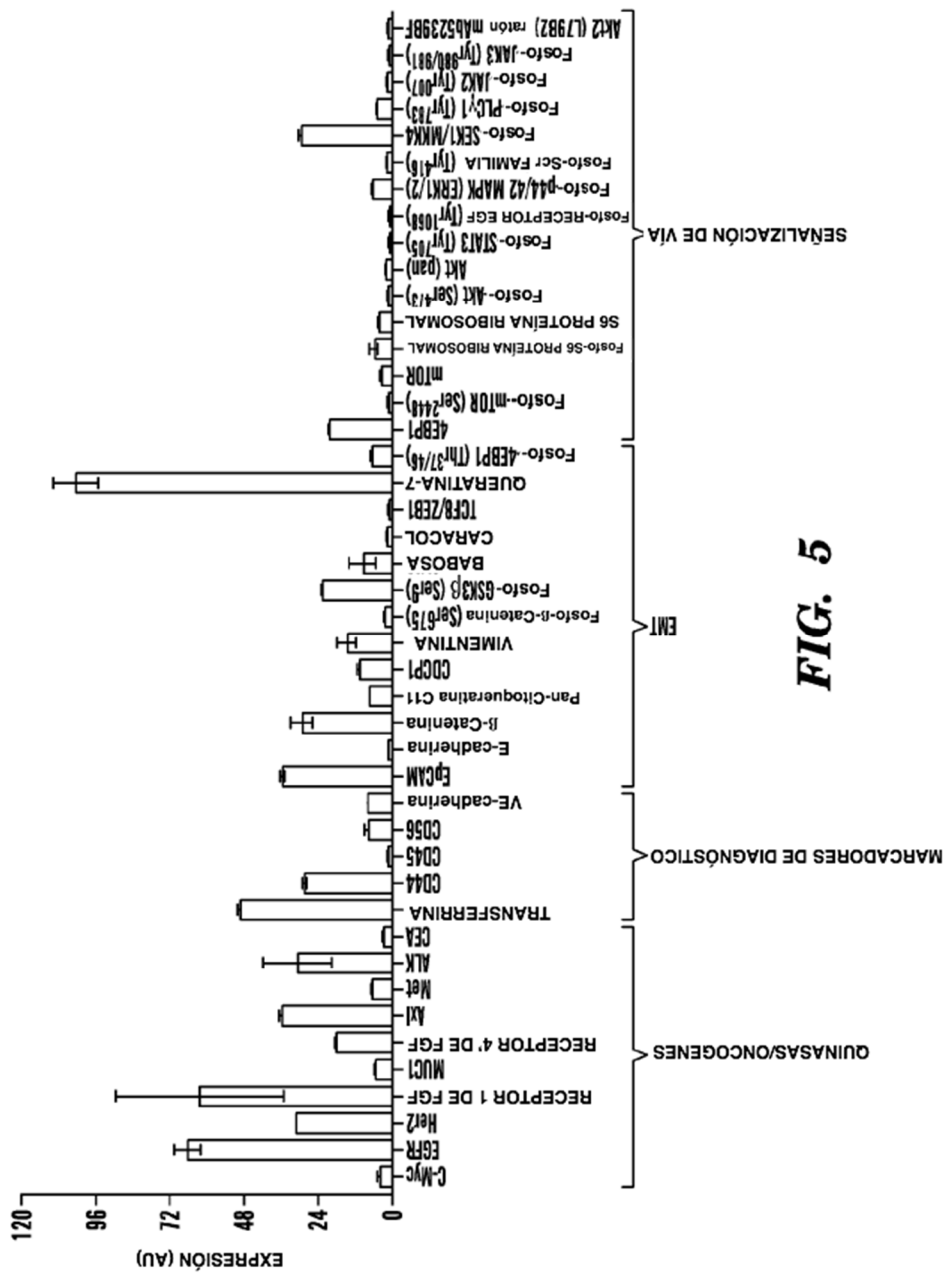
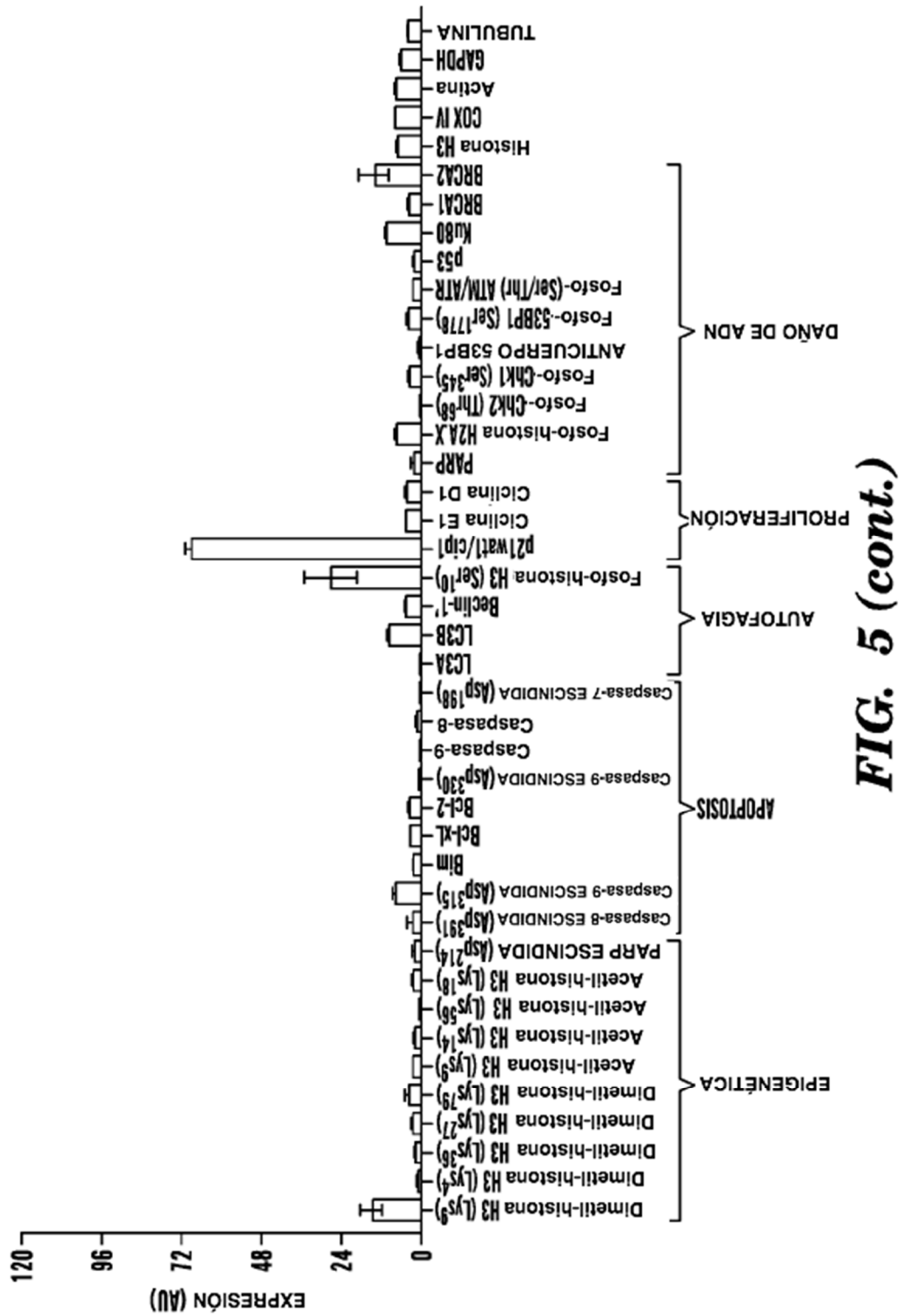


FIG. 4





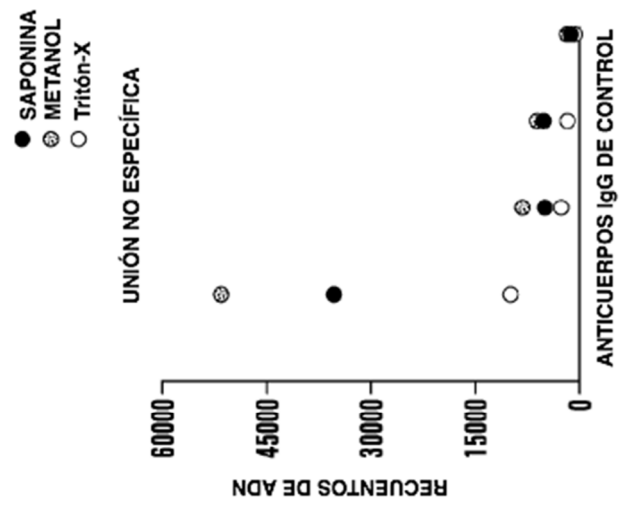


FIG. 6B

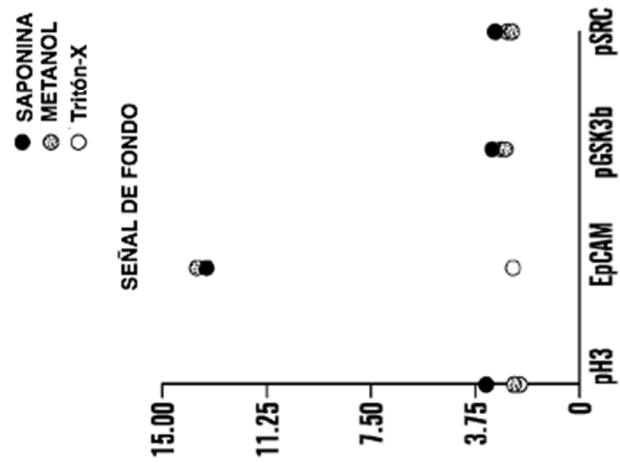


FIG. 6A

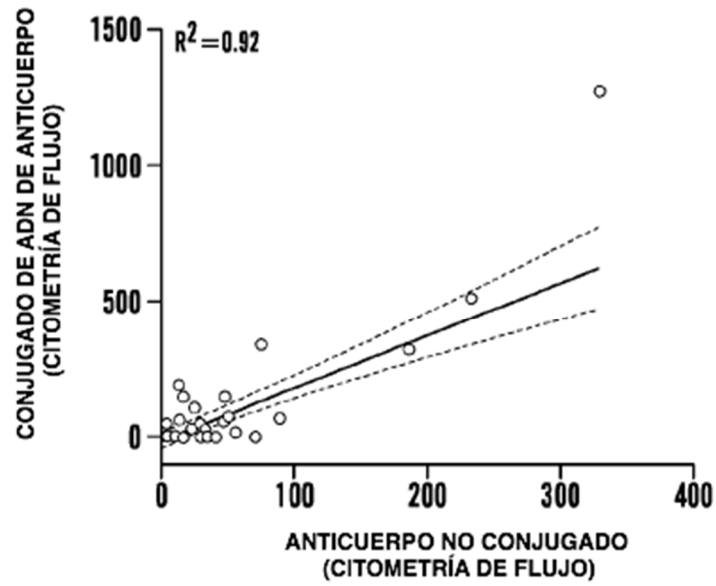


FIG. 7A

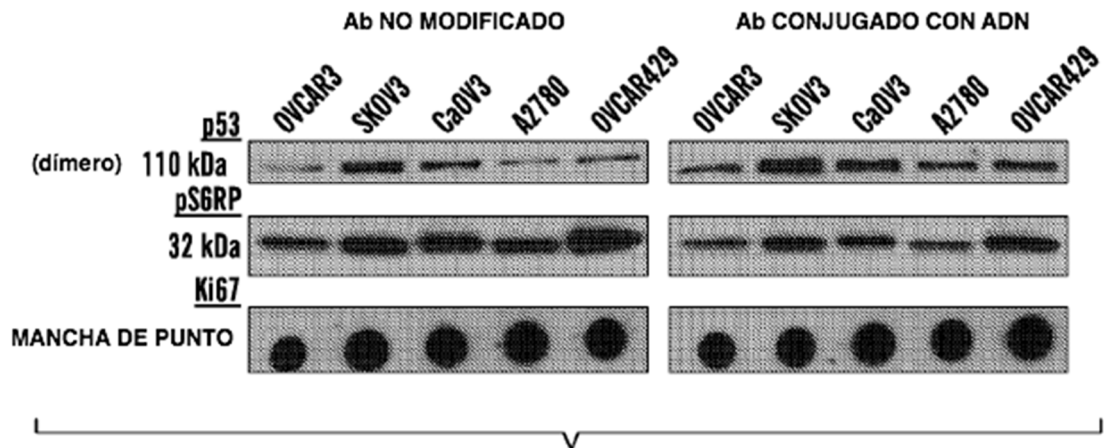


FIG. 7B

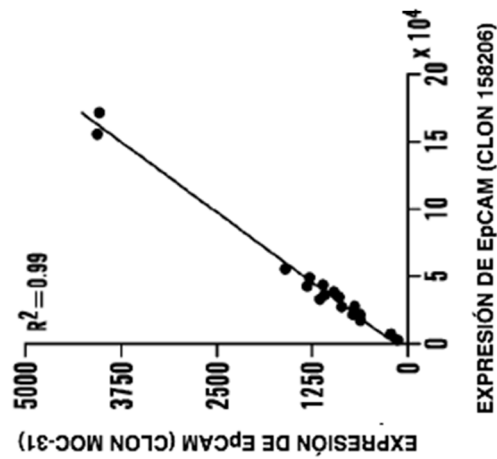


FIG. 8A

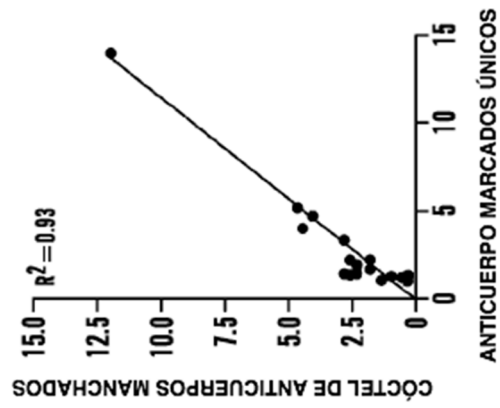


FIG. 8B

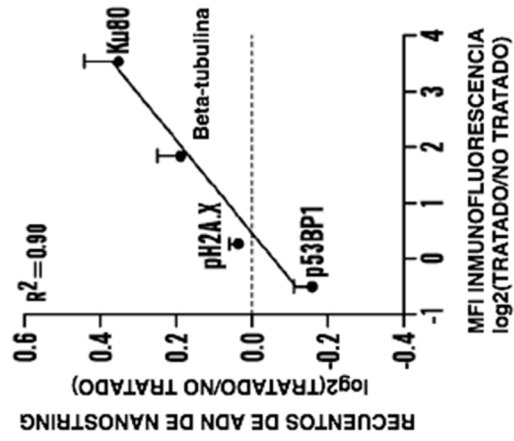


FIG. 8C

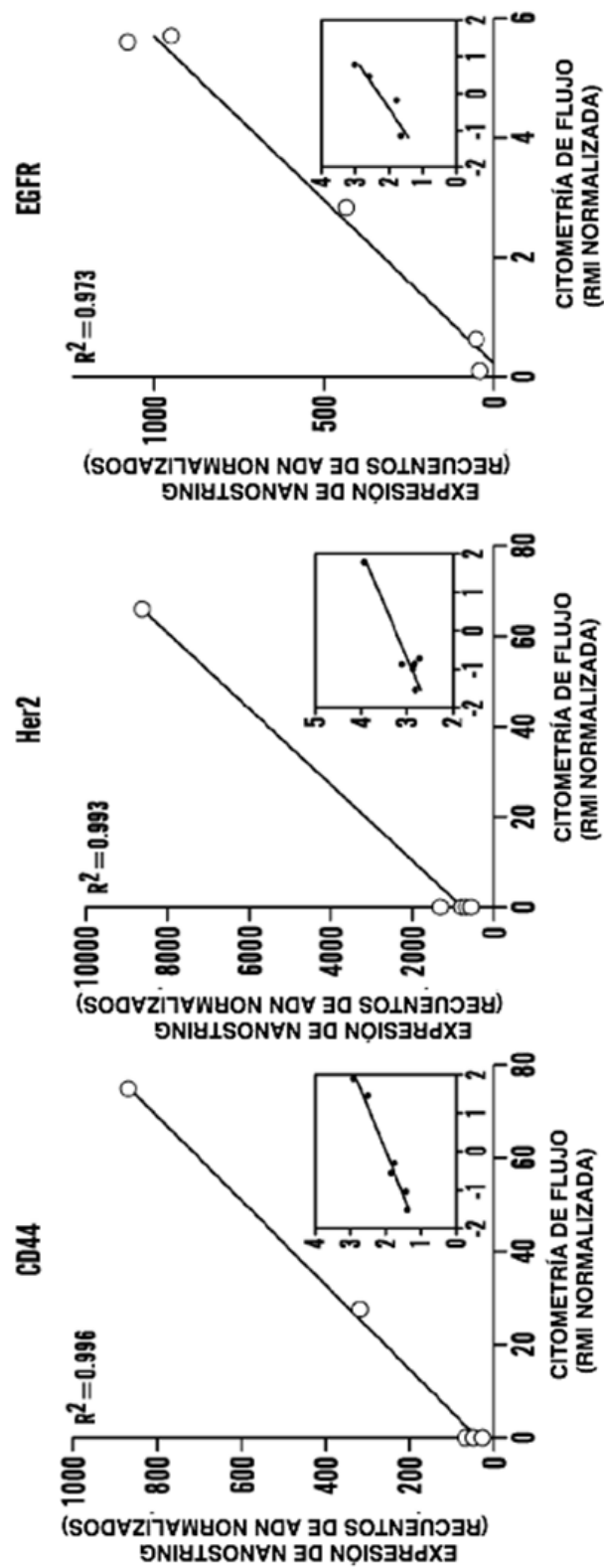


FIG. 9

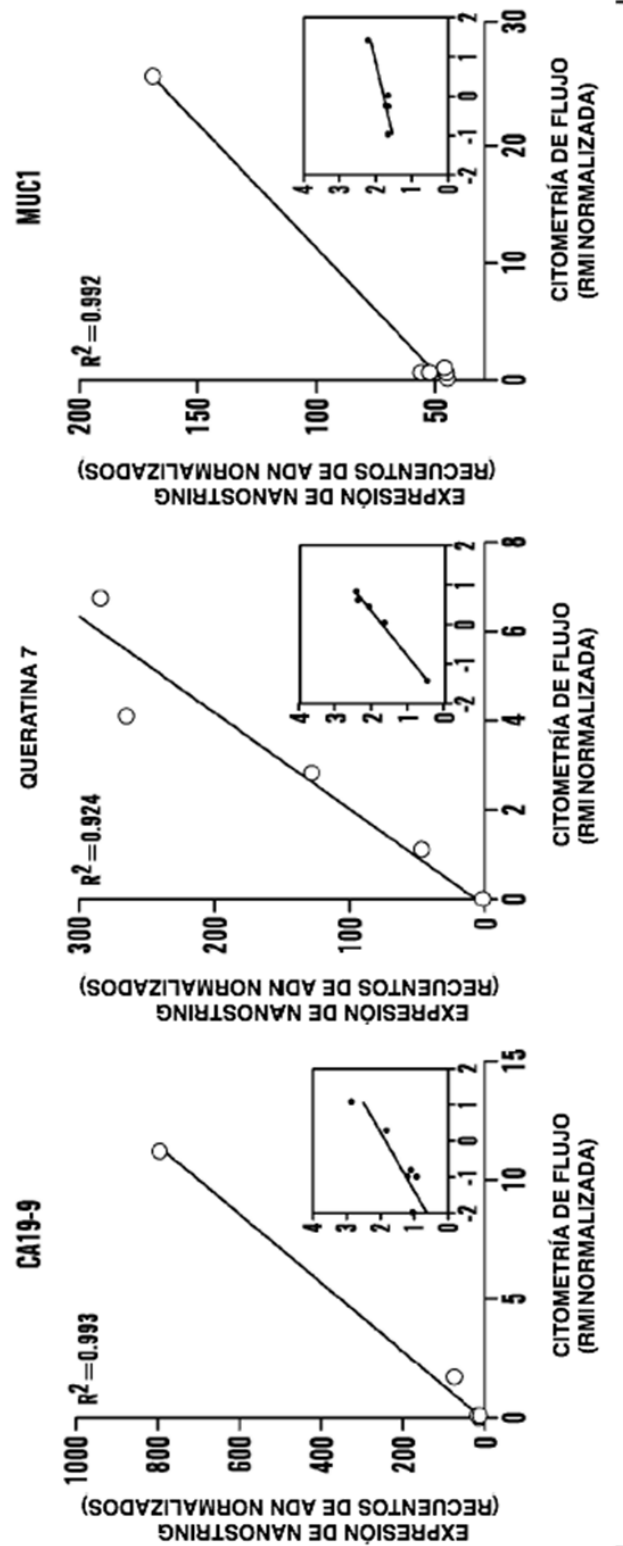
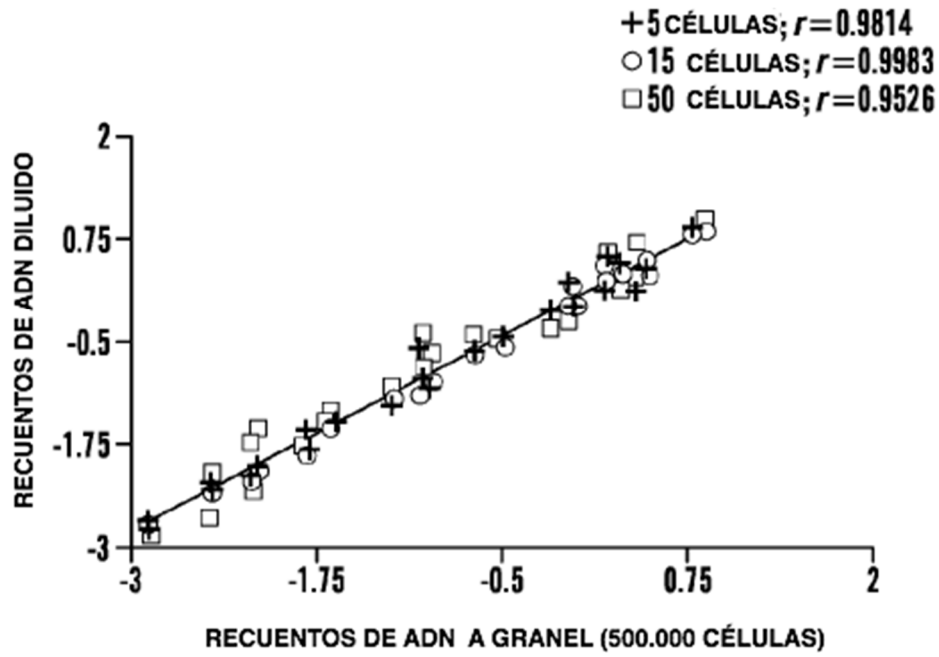


FIG. 9 (cont.)

**FIG. 10A**

CORRELACIÓN A GRANEL	SPEARMAN r	INTERVALO DE CONFIANZA
CÉLULA 1 ÚNICA	0.938	0.897-0.963
CÉLULA 2 ÚNICA	0.963	0.939-0.978
CÉLULA 3 ÚNICA	0.53	0.317-0.686
CÉLULA 4 ÚNICA	0.61	0.426-0.746

FIG. 10B

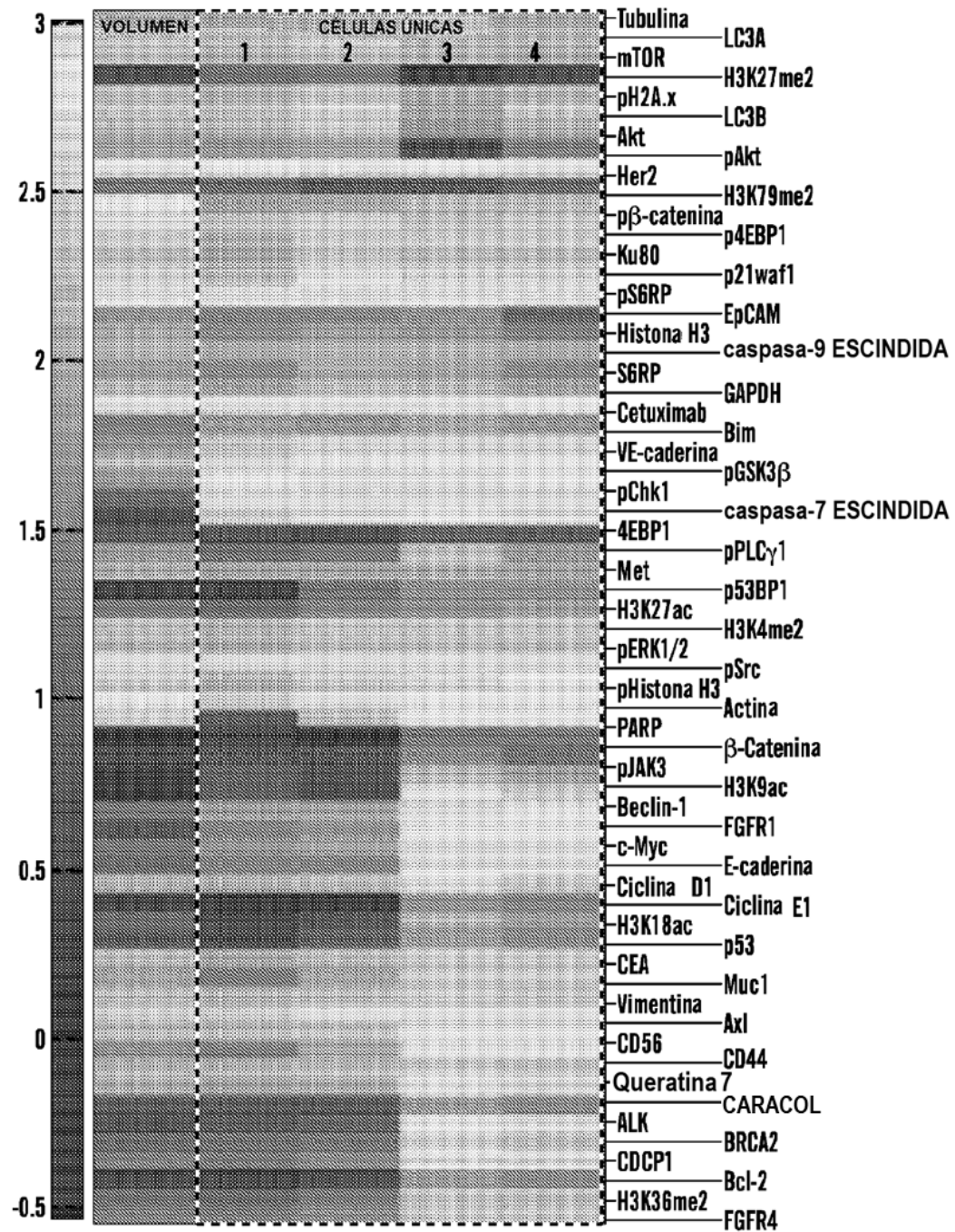


FIG. 10C

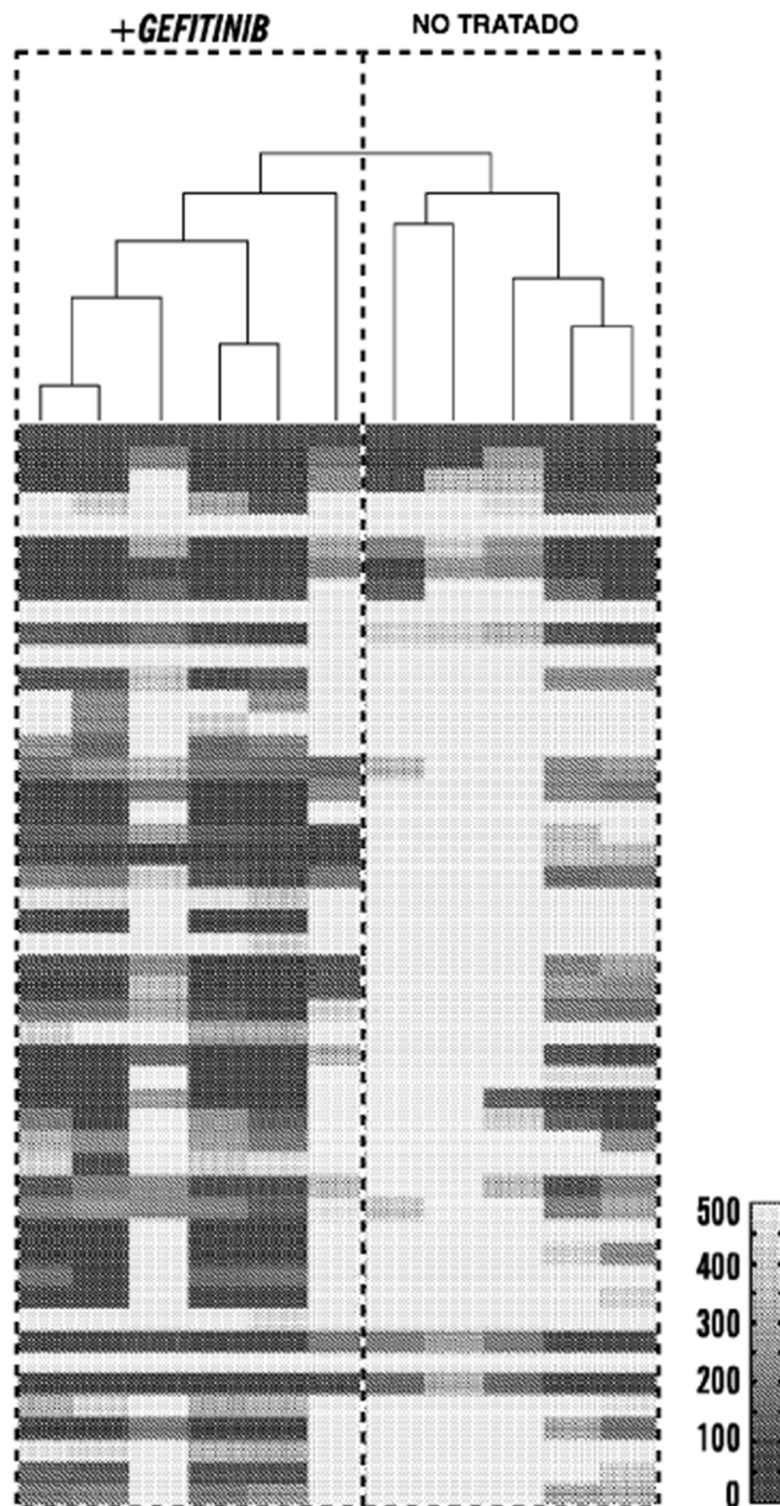


FIG. 11A

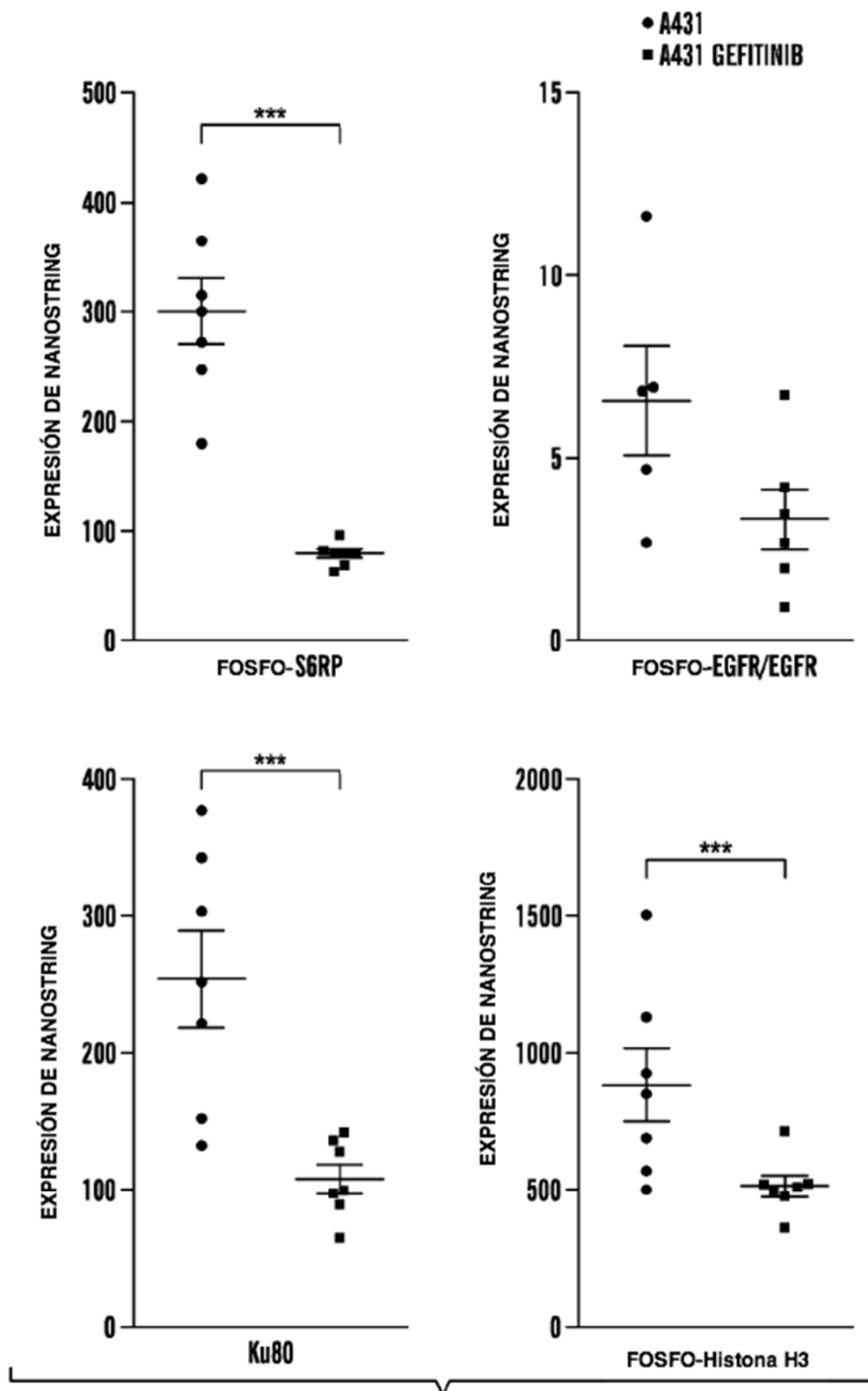
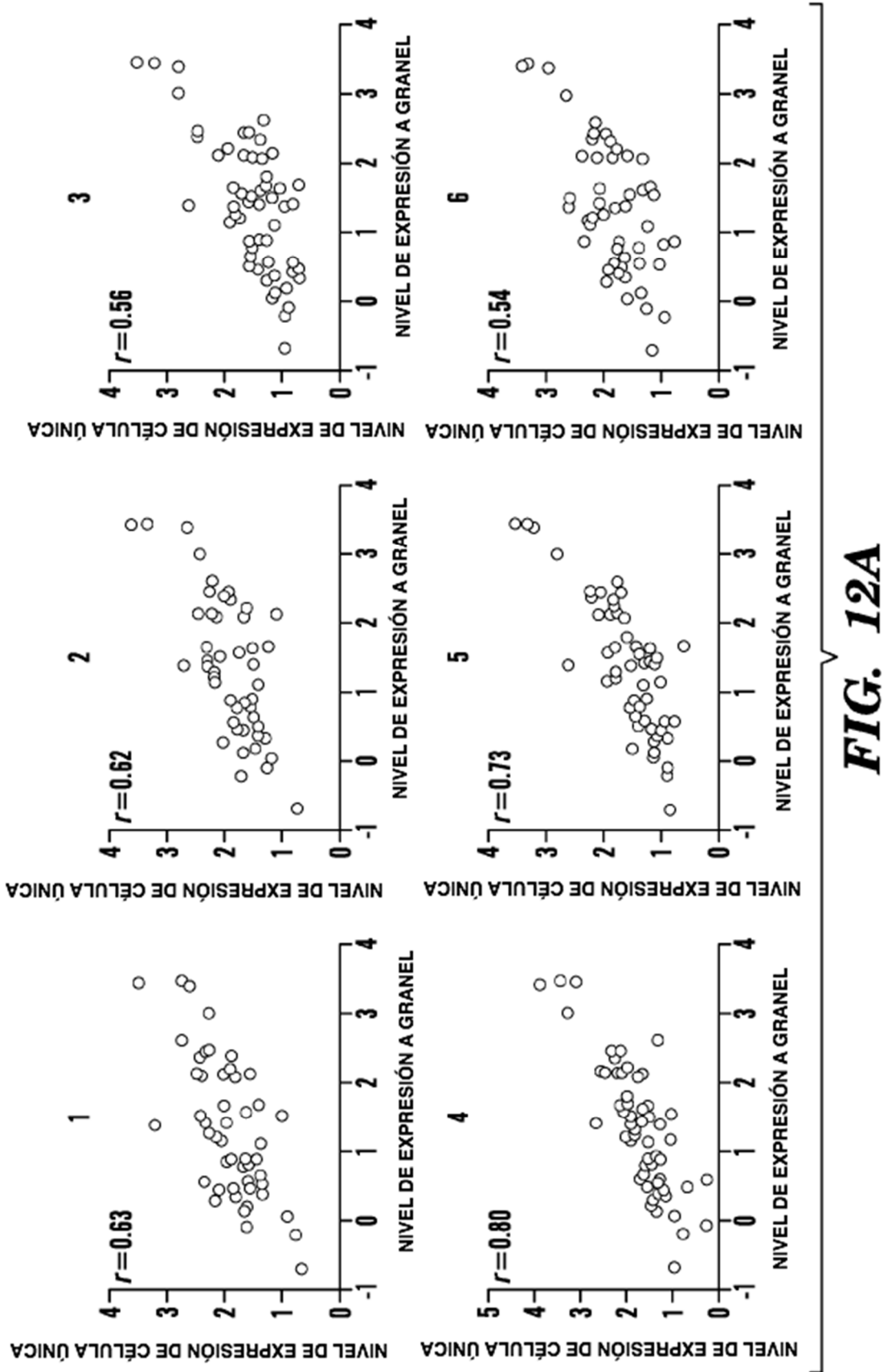


FIG. 11B



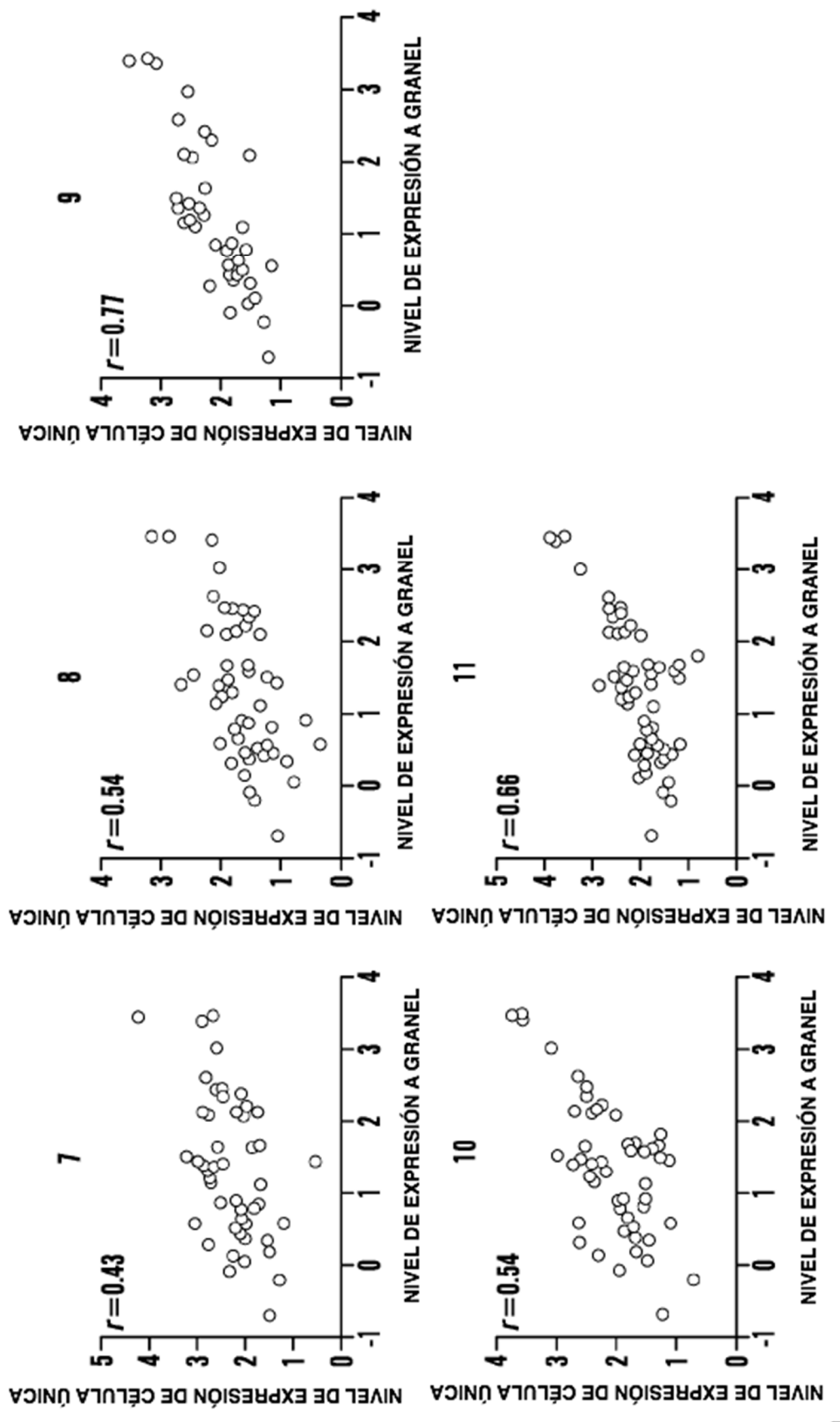


FIG. 12A (cont.)

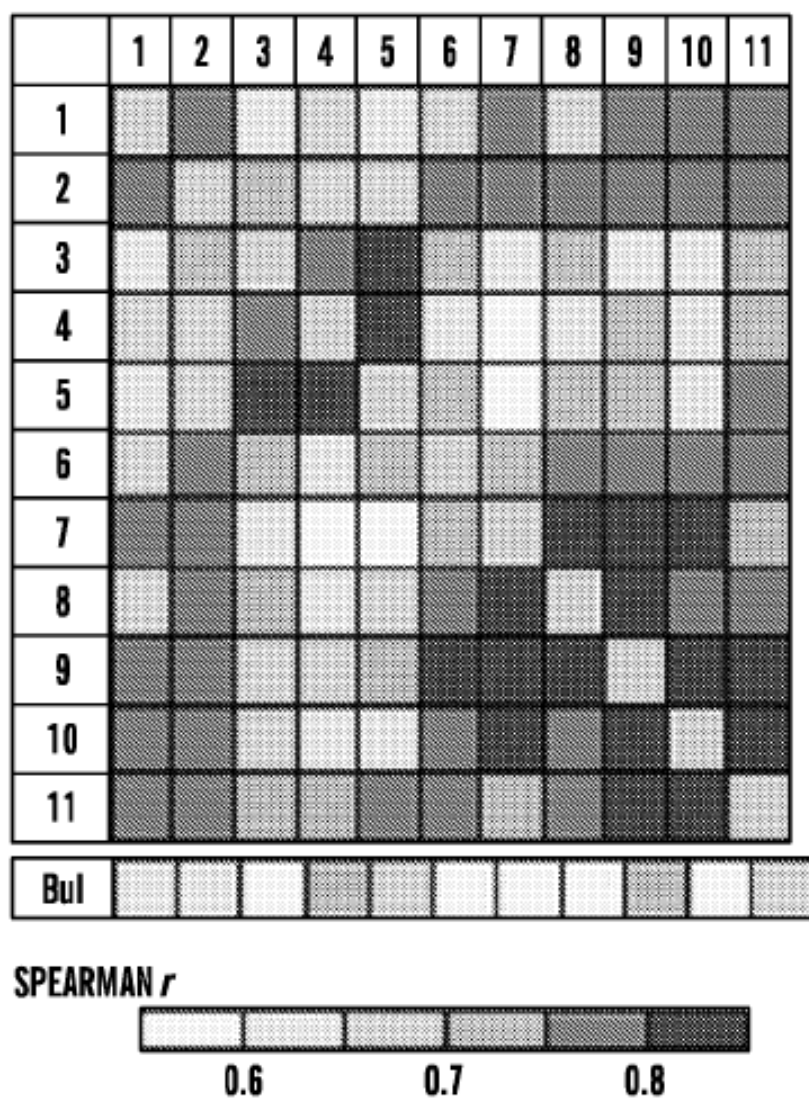
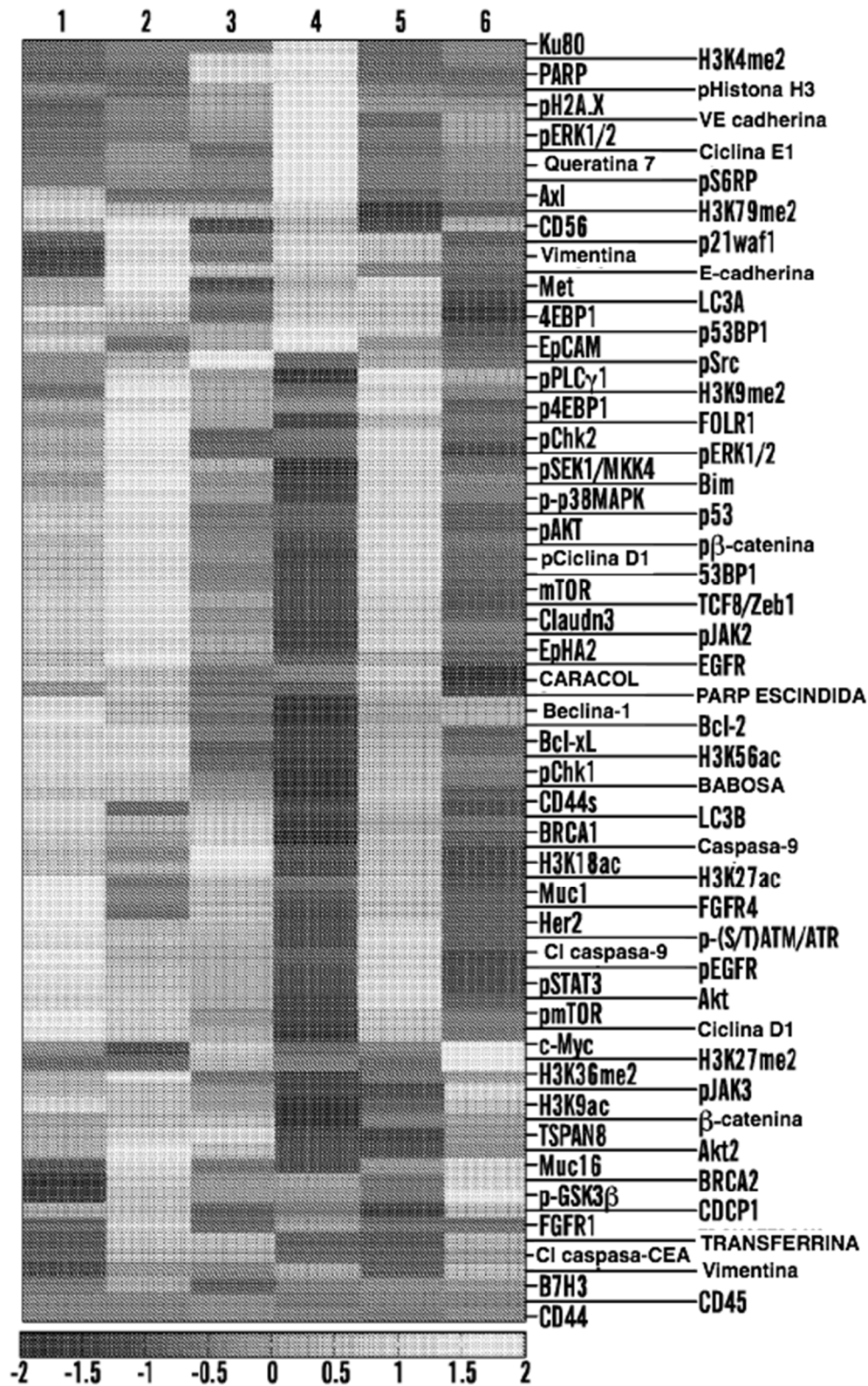


FIG. 12B

**FIG. 13**

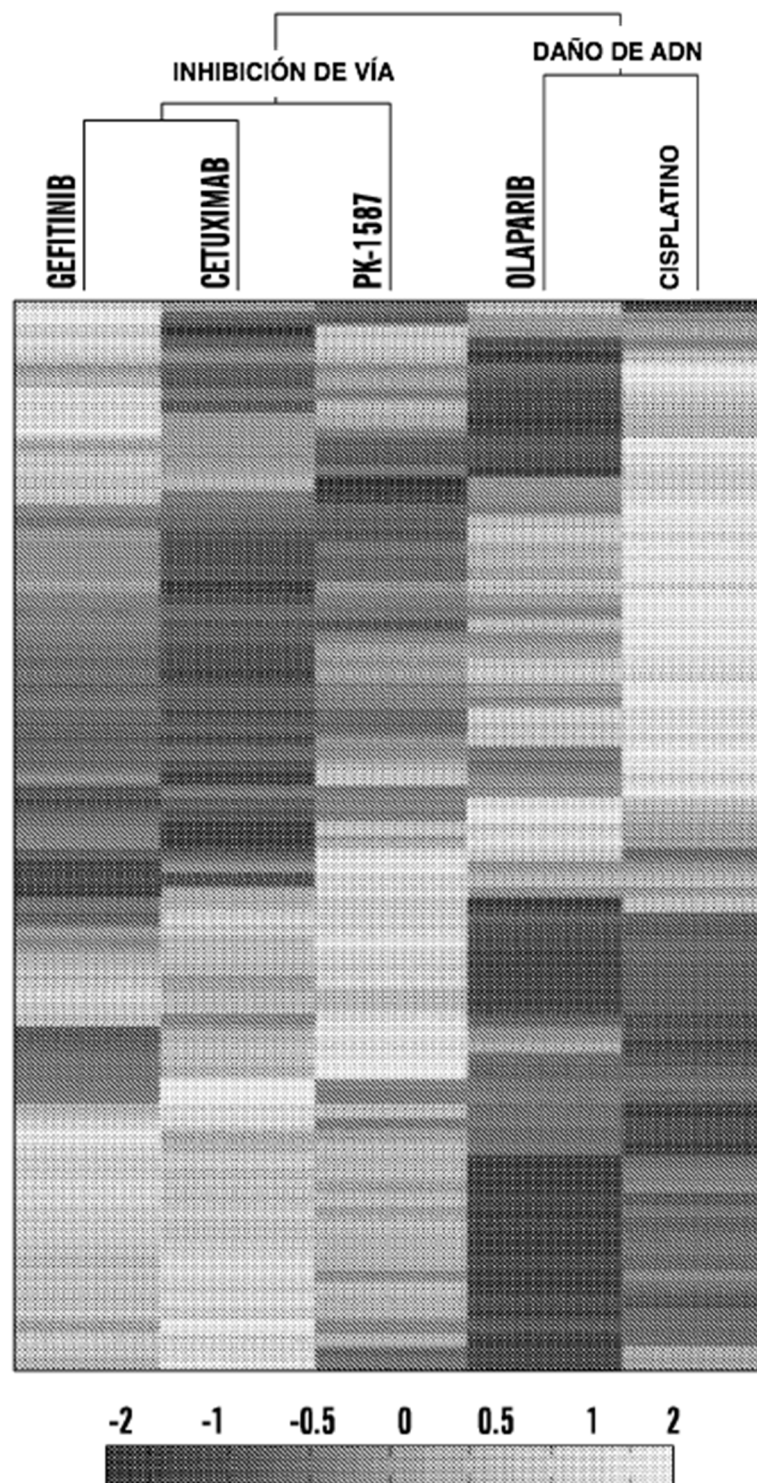


FIG. 14A

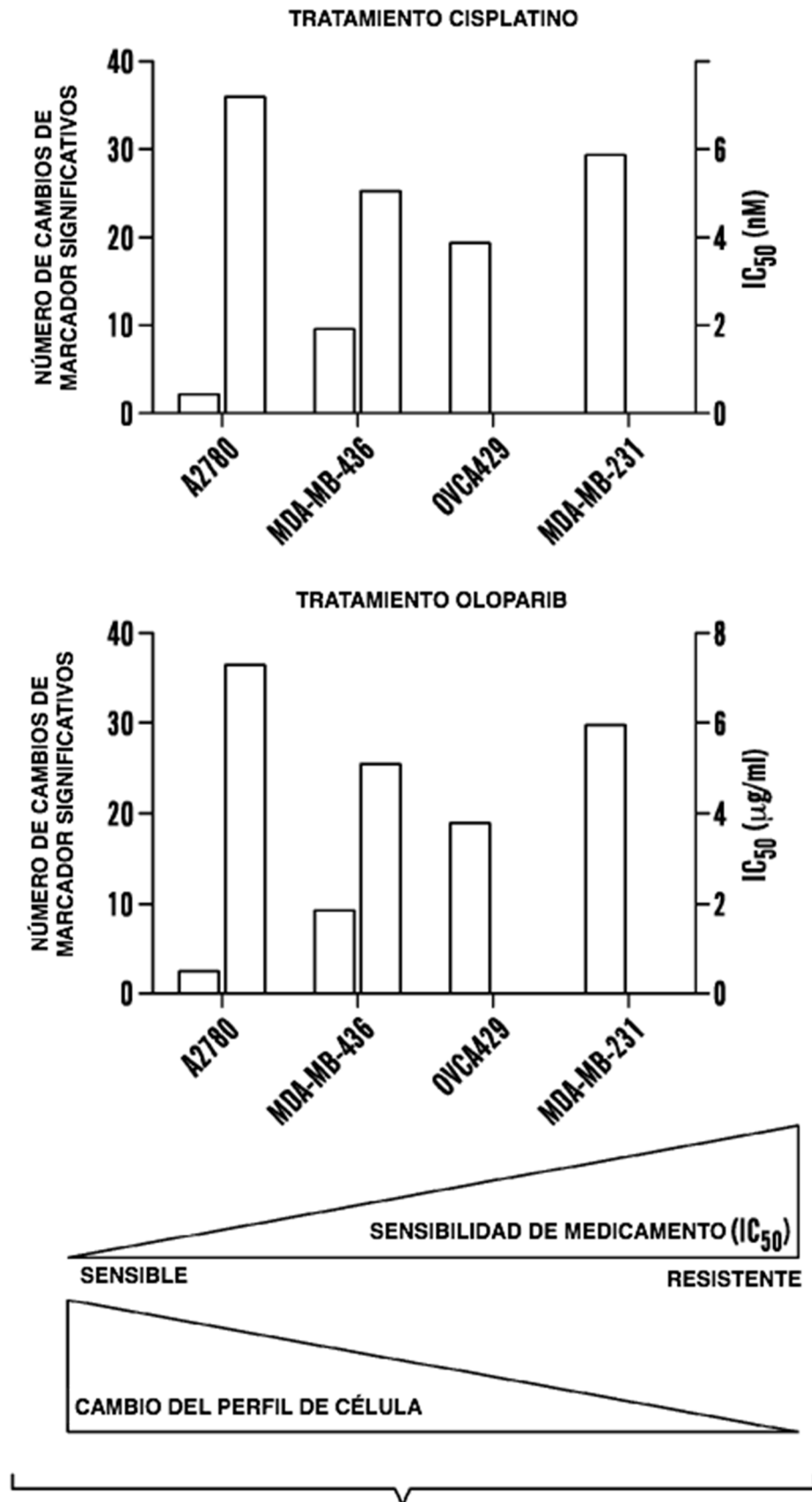


FIG. 14B

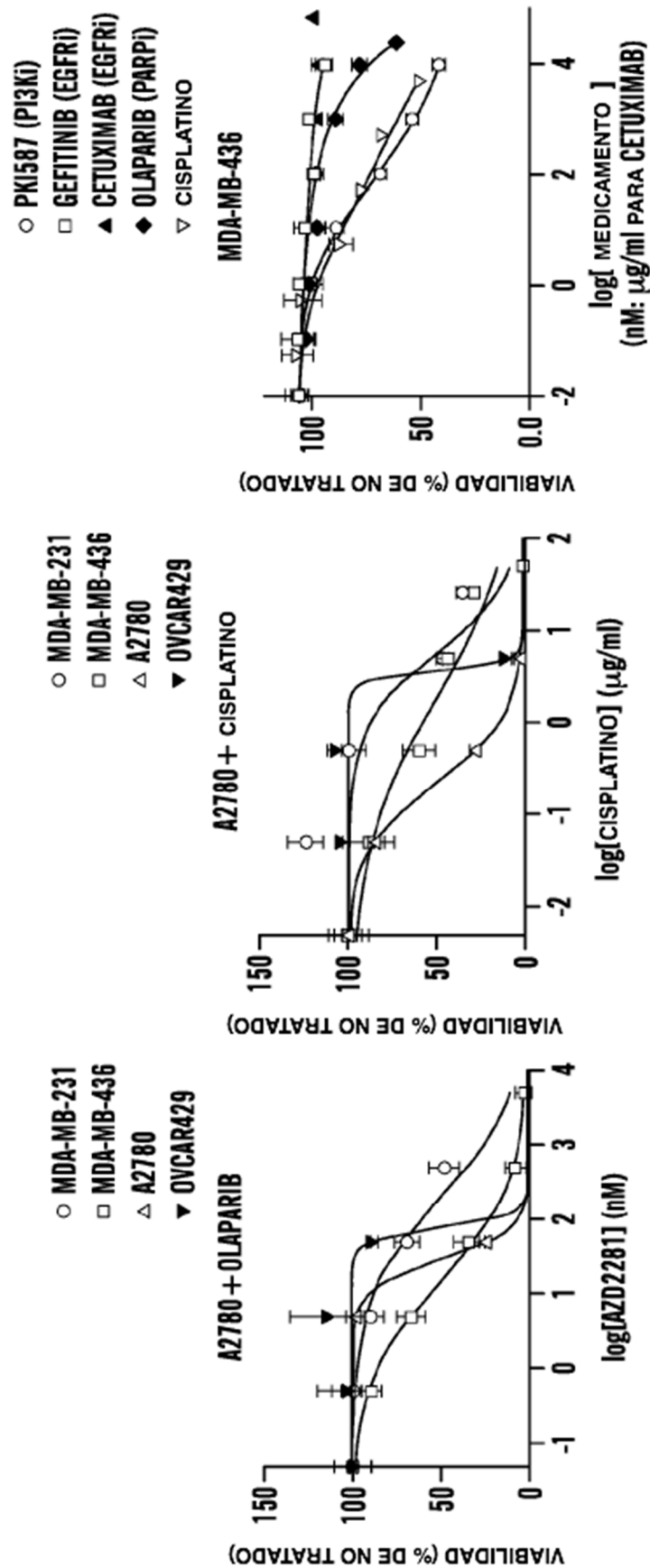


FIG. 15A

436 + CETUXIMAB
12H DE BLOQUEO DE MEDICAMENTO

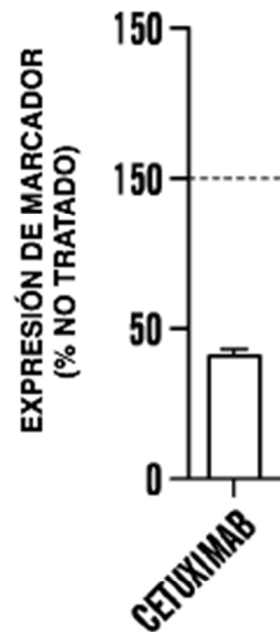


FIG. 15B

A2780 + OLAPARIB, 48 H

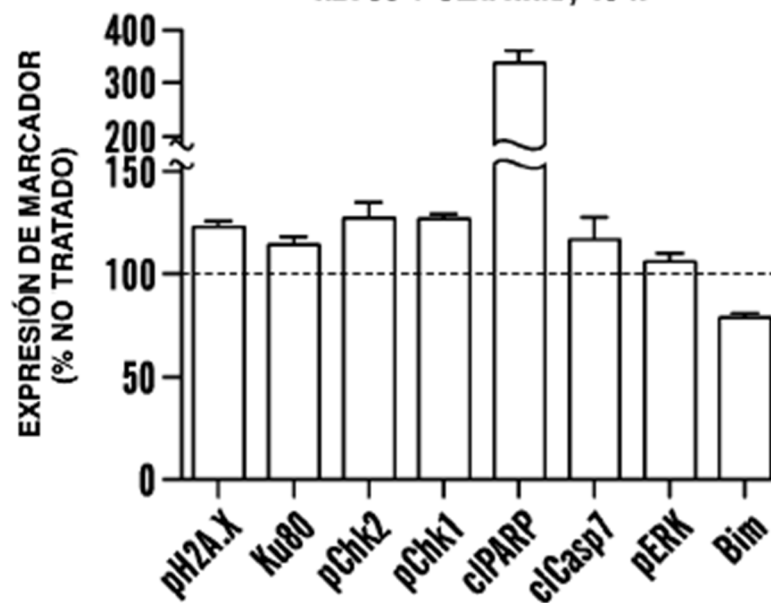


FIG. 15C

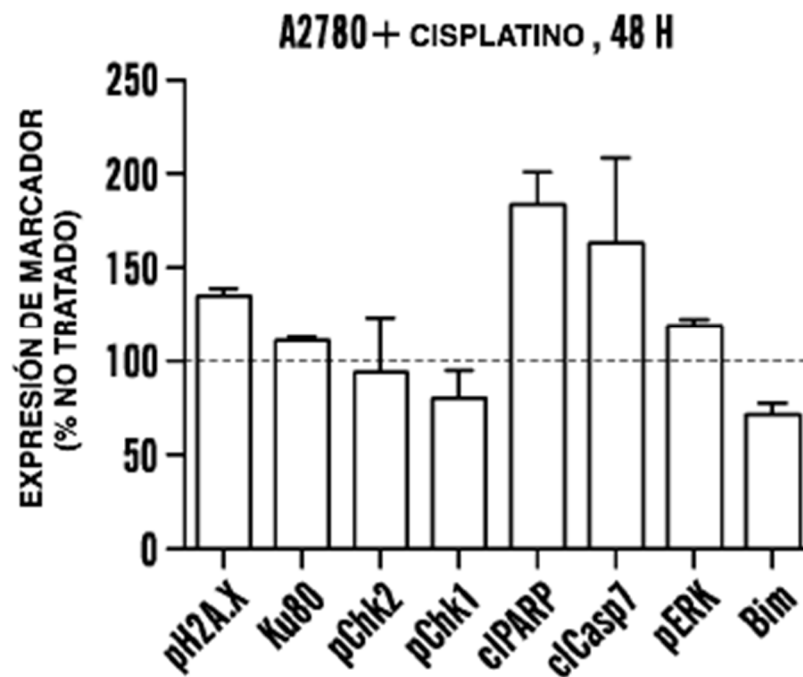


FIG. 15D

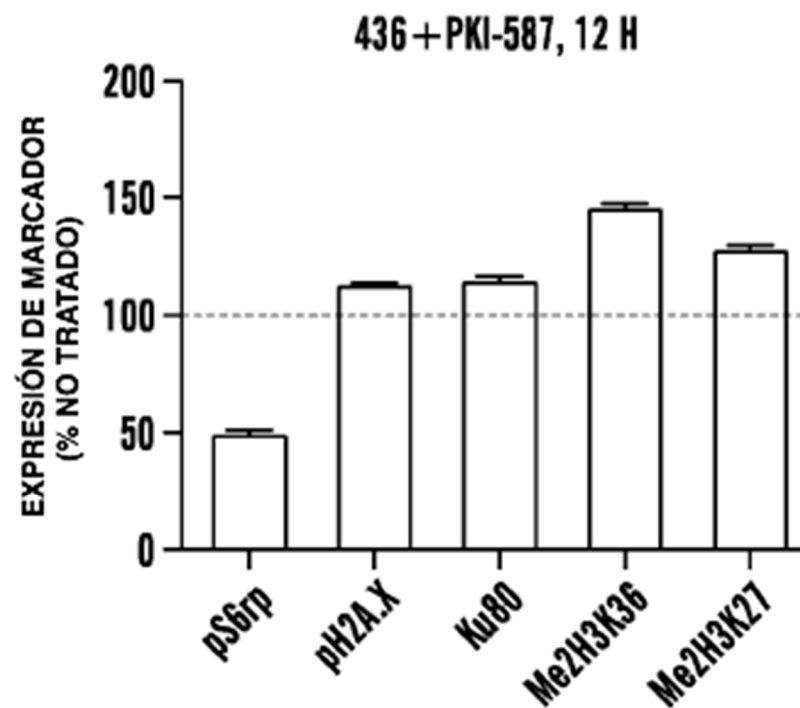


FIG. 15E

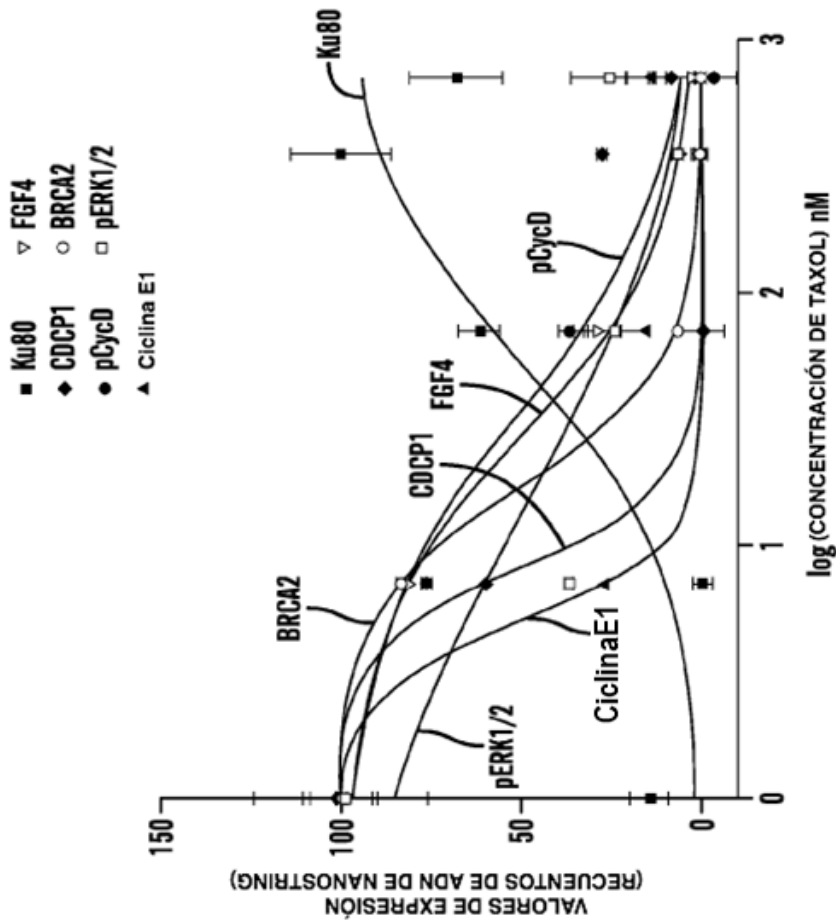


FIG. 16A

MARCADOR	EC50 (nM)	R ²
Phos-53BP1	7.76	0.76
pCiclinaD	34.15	0.88
Ku80	52.92	0.78
FGFR4	26.81	0.95
Ciclina E1	4.971	0.91
BRCA2	17.11	0.84
pERK1/2	12.74	0.78

FIG. 16B

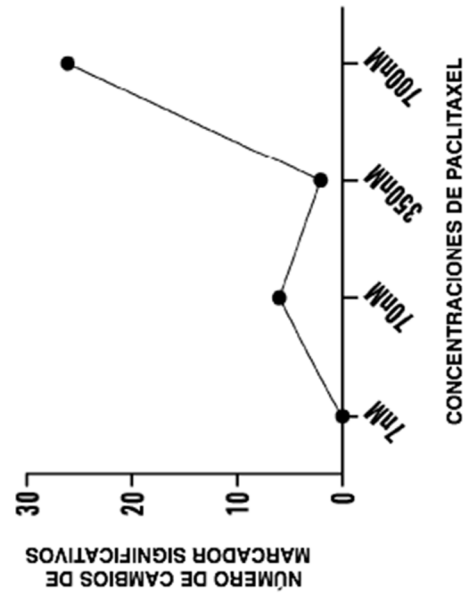


FIG. 16C

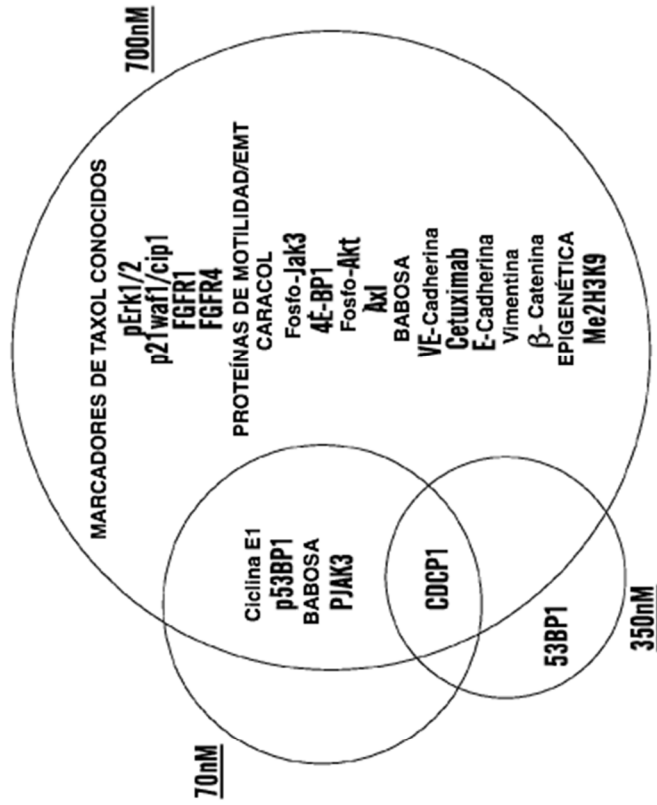


FIG. 16D

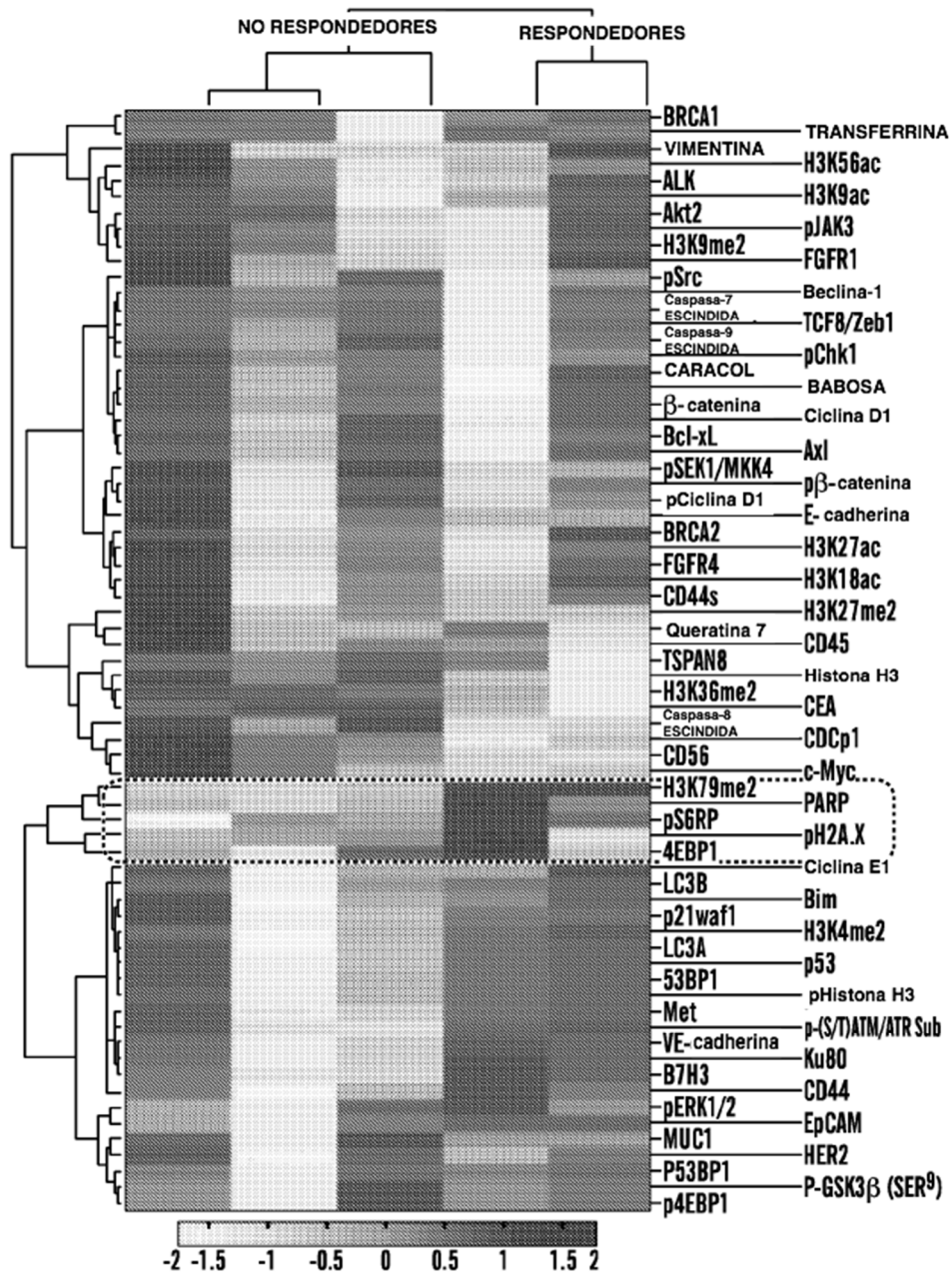


FIG. 17A

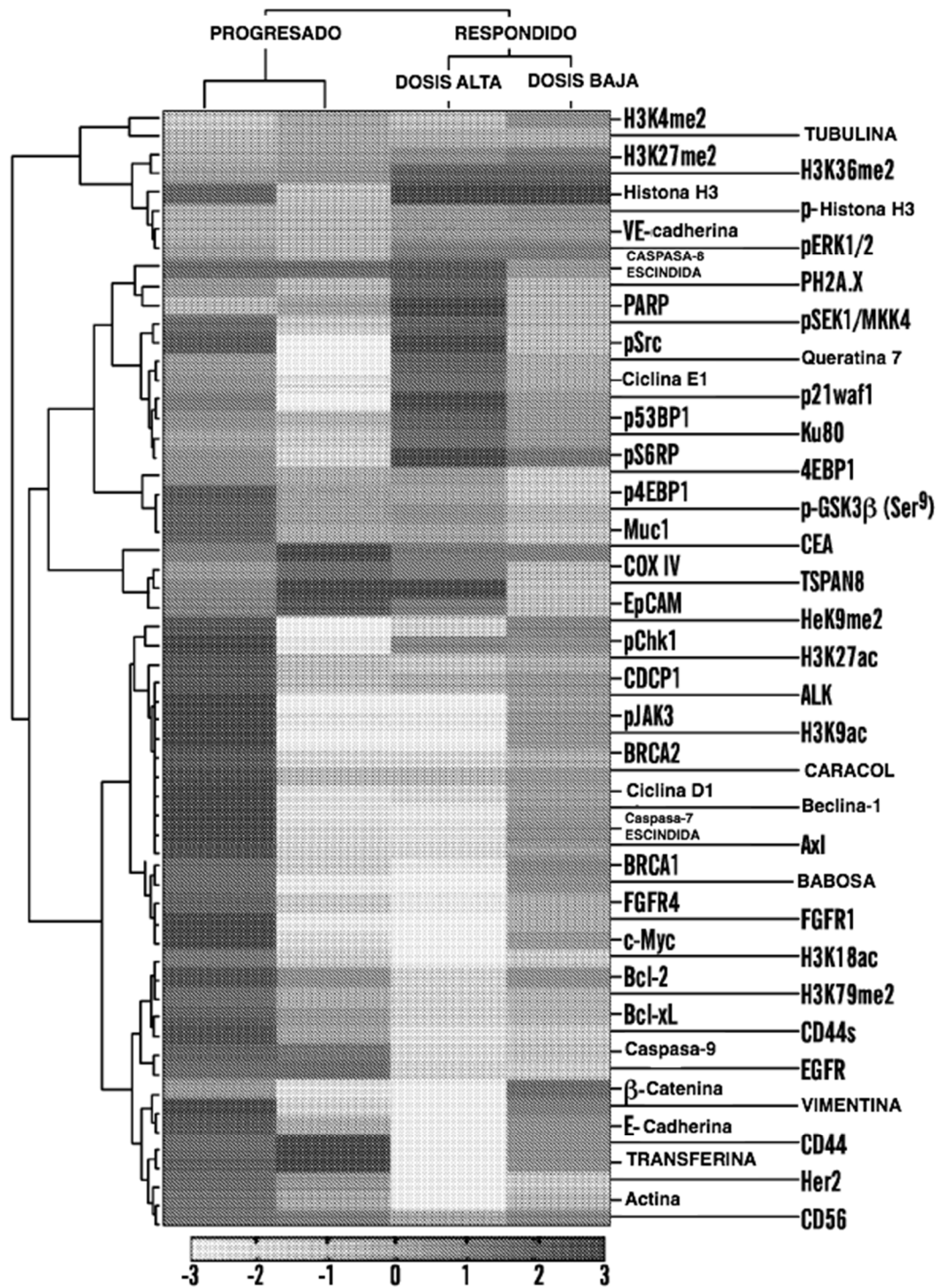


FIG. 17B

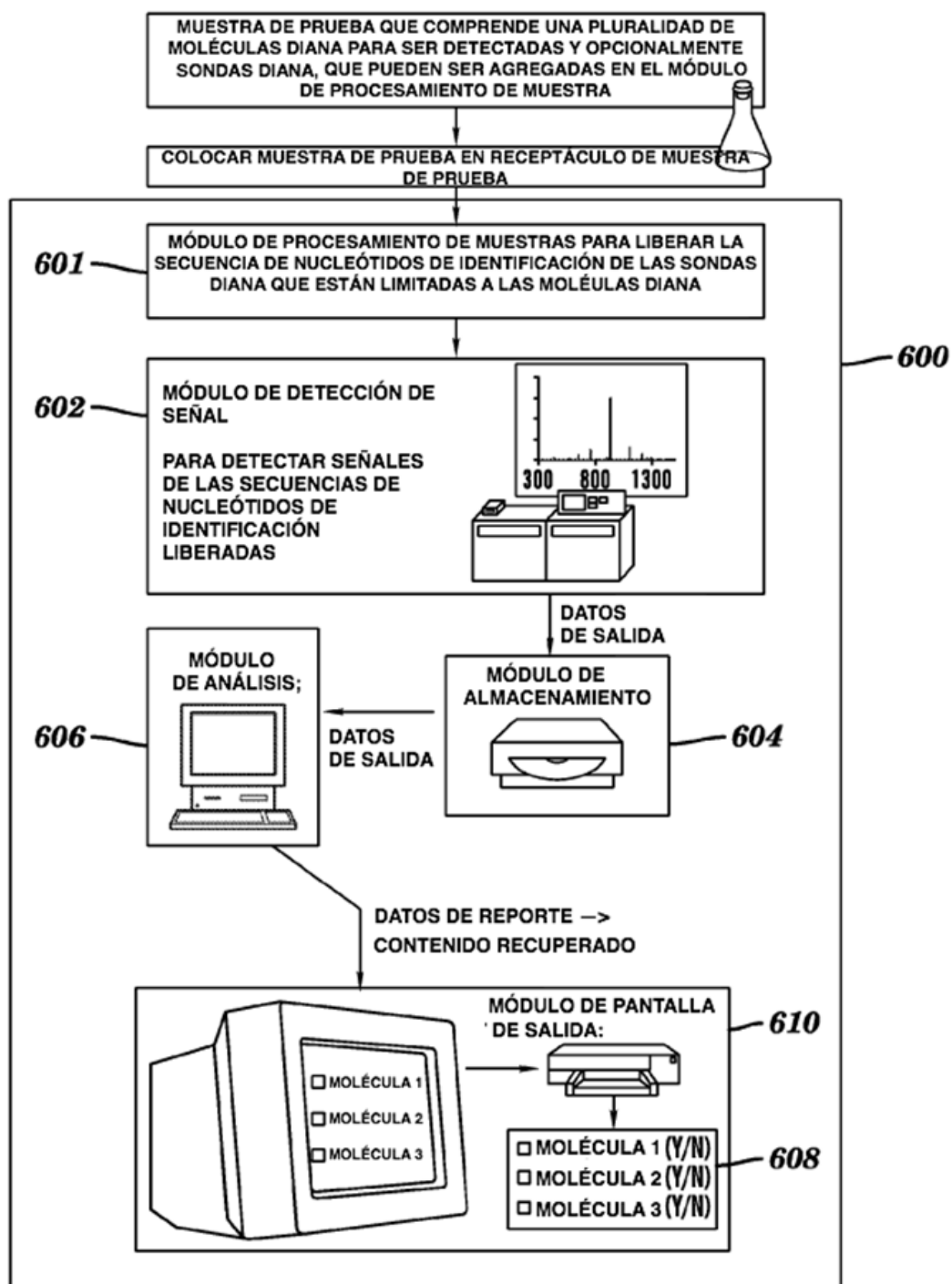
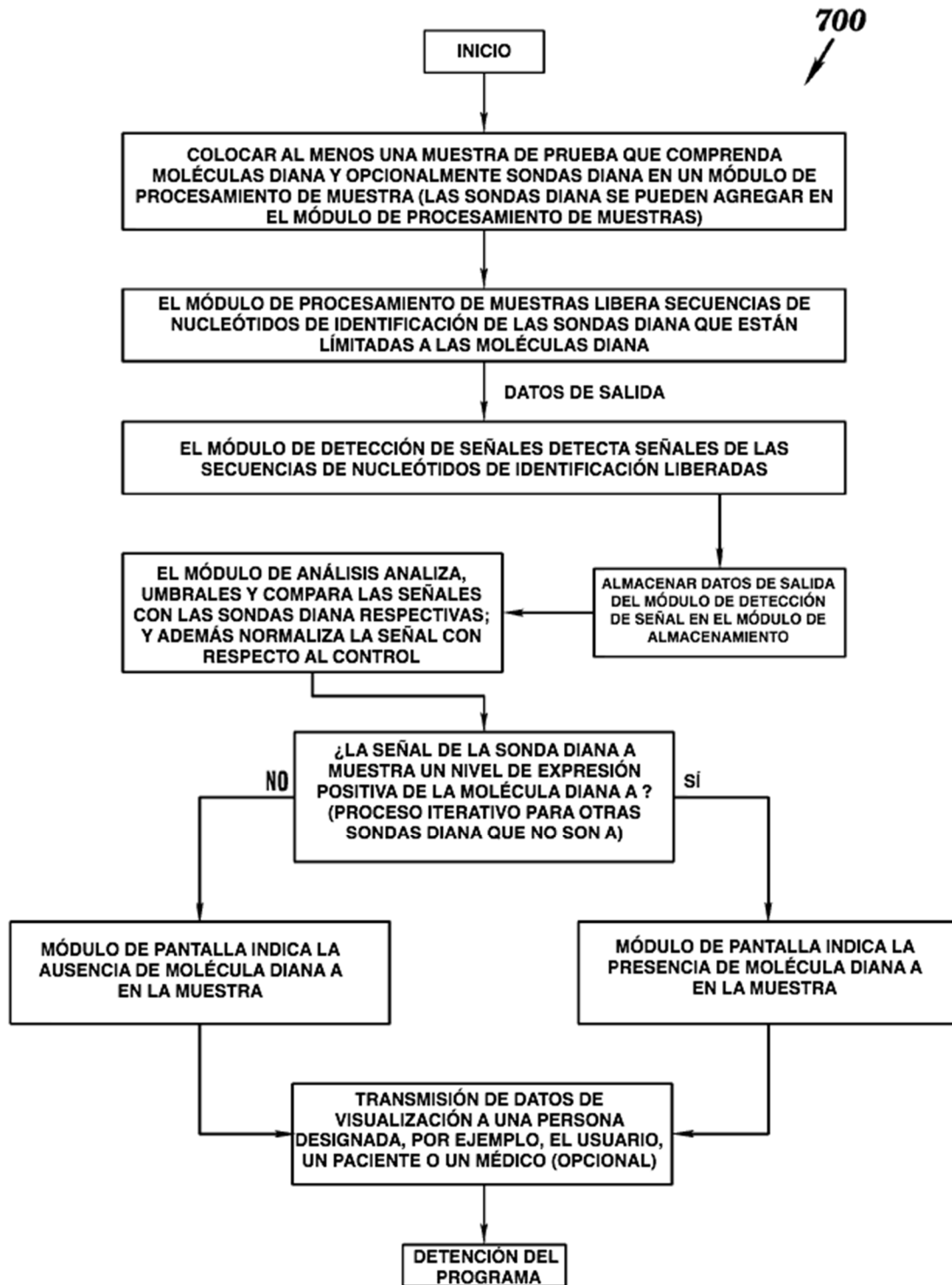


FIG. 18A

**FIG. 18B**