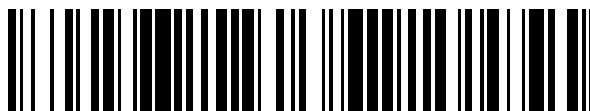


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 788**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12P 19/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06848157 .1**  
96 Fecha de presentación: **22.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1963531**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **NANOINFORMADORES Y MÉTODOS PARA SU PRODUCCIÓN Y USO.**

30 Prioridad:  
**23.12.2005 US 753758 P**  
**08.09.2006 US 843528 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.02.2012**

73 Titular/es:  
**Nanostring Technologies, Inc.**  
**201 Elliot Avenue West, Suite 300**  
**Seattle, WA 98119, US y**  
**Institute for Systems Biology**

72 Inventor/es:  
**GEISS, Gary, K.;**  
**FERREE, Sean, M.;**  
**WEBSTER, Philippa, J. y**  
**DIMITROV, Krassen, M.**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 374 788 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

Nanoinformadores y métodos para su producción y uso.

### 1.CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para la detección y la cuantificación de moléculas diana individuales en muestras biomoleculares. En particular, la invención se refiere a moléculas informadoras marcadas, codificadas, referidas en la presente memoria como "nanoinformadores" marcados, que son capaces de unirse a moléculas diana individuales. A través de los códigos de marcaje de los nanoinformadores, la unión de los nanoinformadores a las moléculas diana da como resultado la identificación de las moléculas diana. También se proporcionan los métodos para elaborar y utilizar dichos nanoinformadores. Los nanoinformadores se pueden utilizar en aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, control de calidad y escrutinio.

### 2.ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere generalmente al campo de la detección, identificación, y cuantificación de moléculas diana en mezclas.

15 Aunque todas las células del organismo humano contienen el mismo material genético, los mismos genes no son activos en todas esas células. Las alteraciones en los patrones de expresión génica pueden tener profundos efectos sobre las funciones biológicas. Estas variaciones en la expresión génica se encuentran en el núcleo de de los procesos fisiológicos alterados y patológicos. Por lo tanto, la identificación y cuantificación de la expresión de los genes en células normales en comparación con las células enfermas puede ayudar al descubrimiento de nuevos fármacos y dianas diagnósticas.

20 Los ácidos nucleicos pueden ser detectados y cuantificados basándose en sus secuencias de polinucleótidos específicas. El principio básico subyacente a los métodos existentes de detección y cuantificación es la hibridación de una secuencia sonda complementaria marcada a una secuencia diana de interés en una muestra. La formación de un dúplex indica la presencia de la secuencia diana en una muestra y el grado de formación de dúplex, medido por la cantidad de marca incorporada en él, es proporcional a la cantidad de secuencia diana.

25 Esta técnica, denominada hibridación molecular, ha sido una herramienta útil para identificar y analizar secuencias de ácidos nucleicos específicas en mezclas complejas. Esta técnica ha sido utilizada en diagnósticos, por ejemplo, para detectar secuencias de ácido nucleico de diferentes microbios en muestras biológicas. Por añadidura, se han utilizado técnicas de hibridación para cartografiar las diferencias genéticas o los polimorfismos entre individuos. Además, se han utilizado estas técnicas para controlar los cambios en la expresión génica en diferentes poblaciones de células o en células tratadas con diferentes agentes.

30 En el documento WO 2005/071401 se describe un método para el análisis simultáneo, en un formato homogéneo, para la detección de múltiples secuencias diana de ácido nucleico. La invención utiliza sondas de captura conjugadas con sustratos que son distinguibles basándose en la firma espectral única combinada con sondas informadoras que tienen una marca detectable por separado. En particular, los sustratos son subconjuntos de microesferas, creados impregnando una combinación de dos colorantes fluorescentes en diferentes proporciones para producir una única firma espectral para cada subconjunto. En presencia de una secuencia diana, se forman complejos detectables que son distinguibles para cada combinación de diana, sonda de captura (que porta objetos subconjuntos de cuentas que contienen una sola firma espectral) y sonda informadora (que contiene una sola señal producida por una marca fluorescente).

40 El documento US 6.268.147 hace referencia a un método para analizar ADN genómico y secuencias expresadas utilizando oligonucleótidos coadyuvantes, previamente recocidas con el ácido nucleico diana de hebra sencilla para formar una molécula diana parcialmente dúplex. El analito de ácido nucleico no marcado (la "secuencia diana") se desnaturaliza y se recuce o se hibrida a un exceso molar de dos o más sondas oligonucleotídicas, al menos una de las cuales está marcada, y que se unen a secuencias diana en una o más regiones de la secuencia conocida, para formar una estructura parcialmente dúplex en la que al menos dos sondas oligonucleotídicas se unen a la secuencia diana en tándem, formando una región dúplex en la que la unión de al menos una sonda es estabilizada por el apilamiento de bases contiguas ininterrumpidas con la sonda hibridante en tándem. Las sondas están marcadas simplemente con marcas o etiquetas detectables.

50 El documento WO 03/003810 hace referencia a sondas individuales, presentes en poblaciones. En particular, este documento describe una población diversa de sondas marcadas únicamente, que contienen alrededor de treinta o más sondas de ácido nucleico específicas de la diana ancladas cada una a una marca única unida a un ácido nucleico, y los métodos de uso de estas sondas para detectar un analito de ácido nucleico.

55 En el pasado, solamente se podían detectar unos pocos genes en una muestra compleja de una vez. En el siglo pasado, varias tecnologías han hecho posible controlar el nivel de expresión de un gran número de transcritos en el interior de una célula al mismo tiempo (véanse, p. ej., Schena et al., 1995, Science 270: 467-470; Lockhart et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 1675-1680; Blanchard et al., 1996, Nature Biotechnology 14:1649). En los

organismos para los cuales se conoce la mayor parte o todo el genoma, es posible analizar los transcritos de un gran número de genes del interior de la célula. La mayor parte de estas tecnologías emplean micromatrices de ADN, dispositivos que consisten en miles de secuencias de ADN inmovilizadas presentes sobre una superficie miniaturizada que han hecho más eficaz este procedimiento. Utilizando una micromatriz, es posible detectar en un solo experimento la presencia o ausencia de miles de genes en una muestra biológica. Esto permite a los investigadores realizar simultáneamente varias pruebas diagnósticas en una muestra, u observar los cambios en el nivel de expresión en miles de genes en un experimento. Generalmente, las micromatrices se preparan uniendo secuencias de ADN a una superficie tal como una membrana de nailon o un portaobjetos de vidrio en localizaciones definidas precisamente sobre una rejilla. Después los ácidos nucleicos de la muestra biológica se marcan y se hibridan a la matriz. El ADN marcado de la muestra marca la posición exacta de la matriz en la que se produce la hibridación, permitiendo la detección automática.

Desafortunadamente, a pesar de la miniaturización de los formatos de las matrices, este método todavía requiere cantidades significativas de la muestra biológica. Sin embargo, en algunos casos, tales como las biopsias de tejidos enfermos o las muestras de un tipo de células discreto, la muestra biológica se encuentra en una provisión limitada. Además, la cinética de la hibridación sobre la superficie de una micromatriz es menos eficaz que la hibridación en pequeñas cantidades de solución acuosa. Por otra parte, si bien existen métodos para estimar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra basándose en el resultado de la hibridación con la micromatriz, la tecnología de las micromatrices hasta ahora no permite la detección de moléculas diana a nivel individual, ni existen métodos basados en micromatrices para cuantificar directamente la cantidad de molécula diana en una muestra dada.

De este modo, existe la necesidad de una detección, identificación y cuantificación exacta y sensible de moléculas diana en mezclas complejas. El comentario o la cita de una referencia en la presente memoria no deberán ser considerados un reconocimiento de que dicha referencia constituya técnica anterior para la presente invención.

### 3.COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a métodos para la generación de diversas poblaciones de moléculas marcadas únicamente, preferiblemente moléculas sintéticas, referidas en la presente memoria como nanoinformadores, que pueden ser utilizadas para la detección, identificación, y cuantificación directa de una amplia variedad de moléculas diana. Los métodos son ventajosos ya que generan un gran número de moléculas informadoras perfectamente marcadas, cada una capaz de detectar una única molécula diana, partiendo solo de un pequeño número de tipos diferentes de monómeros marcadores.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un nanoinformador dual, o un "par de sondas", que comprende dos componentes: una primera sonda y una segunda sonda. La primera sonda es un complejo que comprende: (a) una primera molécula, o un armazón, que comprende: (i) una primera región de anclaje a la marca a la que están unidos (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal y una segunda región de anclaje a la marca, que no es solapante con la primera región de anclaje a la marca, a la que están anclados (directamente, o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal; (ii) una primera secuencia específica de la diana anclada a la primera molécula; y (iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha primera molécula. La segunda sonda es una segunda molécula que comprende (i) una segunda secuencia específica de la diana; (ii) opcionalmente, una tercera región de anclaje a la marca a la que están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y (iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha segunda molécula; donde la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana se unen a diferentes regiones de la misma molécula diana donde la molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de la misma o un complemento de dicho ADNc; donde cuando dicho par de sondas está unido a su molécula diana, la identidad de la primera y la segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica la molécula diana, donde la primera, la segunda y la tercera regiones de anclaje a la marca son secuencias de nucleótidos predeterminadas,

donde, la primera, la segunda, y la tercera señales son distinguibles espacialmente, y

donde una primera molécula de ADN o ARN está hibridada a la primera región de anclaje a la marca, a cuya dicha primera molécula de ADN o ARN están unidos dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una segunda molécula de ADN o ARN está hibridada a la segunda región de anclaje a la marca, a cuya dicha segunda molécula de ADN o ARN están unidos dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

En realizaciones alternativas, la presente invención proporciona un nanoinformador dual, o un "par de sondas", que comprende dos componentes: una primera sonda y una segunda sonda. La primera sonda es un complejo que comprende: (i) una primera molécula que comprende: una primera región de anclaje a la marca a la que están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal y una segunda región de anclaje a la marca que no es solapante con la primera región de anclaje a la marca a la que están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal; (ii) una primera secuencia específica de la diana anclada a la primera molécula y

(iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha primera molécula. La segunda sonda es una segunda molécula que comprende (i) una segunda secuencia específica de la diana; (ii) opcionalmente, una tercera región de anclaje a la cual están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y (iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha segunda molécula; donde la primera señal, la segunda señal y la tercera señal son distinguibles espacialmente o espectralmente; donde la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana se unen a diferentes regiones de la misma molécula diana donde la molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de la misma o un complemento de dicho ADNc, donde cuando dicho par de sondas está unido a su molécula diana, la identidad de la primera y la segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica la molécula diana, donde la primera, la segunda, y la tercera regiones de anclaje a la marca son secuencias de nucleótidos predeterminadas, y

donde una primera molécula de ADN o ARN se hibrida a la primera región de anclaje a la marca, a cuya dicha primera molécula de ADN o ARN están unidos dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una segunda molécula de ADN o ARN se hibrida a la segunda región de anclaje a la marca, a cuya dicha segunda molécula de ADN o ARN están unidos dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

El código puede consistir en la primera y la segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí, o puede consistir en la primera y la segunda señales y señales adicionales generadas de un modo similar a partir de regiones de anclaje a la marca adicionales (sobre la primera o la segunda molécula) y las localizaciones de las señales relativas entre sí.

La molécula de ADN es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc.

En un primer aspecto de los nanoinformadores duales de la invención en el que las regiones de anclaje a la diana son secuencias de nucleótidos, una primera molécula de ADN se hibrida a una primera región de anclaje a la marca, a cuya primera molécula de ADN está unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una segunda molécula de ADN se hibrida a la segunda región de anclaje a la marca, a cuya segunda molécula de ADN están unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

En un segundo aspecto de los nanoinformadores duales de la invención en el que las regiones de anclaje a la diana son secuencias de nucleótidos, una primera molécula de ARN se hibrida a la primera región de anclaje a la marca, a cuya primera molécula de ARN están unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una segunda molécula de ADN se hibrida a la segunda región de anclaje a la marca, a cuya segunda molécula de ADN están unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

En un tercer aspecto de los nanoinformadores duales de la invención en el que las regiones de anclaje a la diana son secuencias de nucleótidos, una pluralidad de primeras moléculas de ADN se hibridan a la primera región de anclaje a la marca, a cuyas moléculas de ADN están unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una pluralidad de segundas moléculas de ADN se hibridan a la segunda región de anclaje a la marca, a cuyas segundas moléculas de ADN están unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

En un cuarto aspecto de los nanoinformadores duales de la invención en el que las regiones de anclaje a la diana son secuencias de nucleótidos, una pluralidad de primeras moléculas de ARN se hibridan a la primera región de anclaje a la marca, a cuyas moléculas de ARN están unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una pluralidad de segundas moléculas de ARN se hibridan a la segunda región de anclaje a la marca, a cuyas segundas moléculas de ARN están unidos (directamente o indirectamente) dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

En ciertas realizaciones de los nanoinformadores duales de la invención, la segunda sonda es un complejo de ácido nucleico que comprende: (a) la segunda molécula de ácido nucleico (armazón), donde la segunda molécula de ácido nucleico comprende una tercera región de anclaje a la marca a la que se hibrida una tercera molécula de ARN, a cuya tercera molécula de ARN están unidos (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y (b) la segunda secuencia específica de la diana anclada covalentemente a la segunda molécula de ácido nucleico, donde el código comprende la identidad de la primera, la segunda y la tercera señales y sus localizaciones relativas entre sí. En ciertas realizaciones, los monómeros marcadores anclados a las primeras regiones de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye dicha primera señal, y los monómeros marcadores anclados a la segunda región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la segunda señal, y los monómeros marcadores anclados a la tercera región de anclaje de la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la

tercera señal. En otras realizaciones, al menos una de la primera señal, la segunda señal y la tercera señal comprenden luz a una pluralidad de longitudes de onda diferentes. La primera, la segunda y la tercera señales pueden ser distinguibles espectralmente. Alternativamente, la primera y tercera señales emiten a la misma longitud de onda o a las mismas longitudes de onda.

5 La primera sonda y la segunda sonda comprenden una etiqueta de afinidad. Asimismo, en realizaciones específicas, la segunda sonda comprende una tercera región de anclaje a la marca a la que están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal. Preferiblemente, la primera y segunda moléculas son moléculas de ácido nucleico; más preferiblemente, las regiones de anclaje a la marca y las secuencias específicas de la diana son secuencias de nucleótidos predeterminadas. En ciertas realizaciones de los nanoinformadores duales de la invención, los uno o más monómeros marcadores anclados a una o ambas regiones de anclaje a la marca están unidos covalentemente a ácidos nucleicos hibridados a sus respectivas regiones de anclaje, o están unidos covalentemente a ácidos nucleicos que están unidos a las respectivas regiones de anclaje a la marca indirectamente a través de uno o más ácidos nucleicos formadores de puentes.

10 En ciertas realizaciones de los nanoinformadores duales de la invención, las segundas secuencias específicas de la diana no están marcadas con uno cualquiera o más de dichos monómeros marcadores; sin embargo, al menos una secuencia específica de la diana de un nanoinformador está anclada a un armazón que está anclado directamente o indirectamente a uno o más monómeros marcadores.

15 En otras realizaciones de los nanoinformadores duales de la invención, la segunda molécula comprende adicionalmente una cuarta región de anclaje a la marca a la que están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una cuarta señal. Preferiblemente, cuando dicho nanoinformador dual está unido a su molécula diana, el código comprende la identidad de la primera señal, la segunda señal, la tercera señal y la cuarta señal y sus localizaciones relativas entre sí.

20 No obstante, no es necesario que el segundo ácido nucleico comprenda una tercera región de anclaje a la marca a la cual están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal. Tales sondas son referidas en la presente memoria como "sondas fantasma". Las sondas fantasma contienen una secuencia específica de la diana, que mejora la cinética de hibridación de un nanoinformador a su molécula diana, y, opcionalmente, una etiqueta de afinidad que se puede utilizar para inmovilizar y estirar el nanoinformador dual. En las realizaciones de los nanoinformadores que emplean una sonda fantasma, la primera molécula (a la que están anclados los monómeros marcadores y que a veces es referida en la presente memoria como "sonda informadora") es preferiblemente una molécula de ácido nucleico de alrededor de 2.000 a alrededor de 10.000 bases de longitud, más preferiblemente de alrededor de 5.000 a alrededor de 8.000 bases de longitud, y la segunda molécula (la "sonda fantasma") es preferiblemente una molécula de ácido nucleico de alrededor de 40 a alrededor de 250 bases de longitud, más preferiblemente de alrededor de 50 a 100 bases de longitud. En una realización específica, tanto la primera molécula como la segunda molécula son moléculas de ADN.

25 Según se utiliza en la presente memoria, el uso de los términos "alrededor de" y "aproximadamente" delante de un número o intervalo representan ese número o intervalo más o menos el 5%.

30 Se puede anclar indirectamente una etiqueta de afinidad a la primera sonda o a la segunda sonda. Por ejemplo se puede anclar covalentemente una etiqueta de afinidad a un oligonucleótido hibridado a la primera o la segunda sondas, o se puede anclar covalentemente a un oligonucleótido hibridado a un "parche" que está hibridado al armazón de la primera y/o la segunda sondas. Alternativamente, la etiqueta de afinidad está anclada covalentemente a la primera molécula de ácido nucleico y/o a la segunda molécula de ácido nucleico de la primera y la segunda sondas.

35 Las señales emitidas por los monómeros marcadores anclados a una región de anclaje a la marca dada pueden ser iguales o diferentes. De este modo, en una realización, los monómeros marcadores anclados a una región de anclaje a la marca (p. ej., primera o segunda) específica emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la señal correspondiente a la región de anclaje a la marca. Alternativamente, en otra realización, al menos una de la primera señal y la segunda señal comprende luz a una pluralidad de longitudes de onda diferentes.

40 Preferiblemente, en ciertas realizaciones, las señales emitidas por los monómeros marcadores anclados a regiones de anclaje a la marca adyacentes son distinguibles espectralmente. De este modo, en realizaciones específicas, la primera y la segunda señales son distinguibles espectralmente.

45 Los autores de la presente invención también describen una sonda, que puede ser un nanoinformador singular o uno o ambos de los dos componentes de un nanoinformador dual, siendo dicha sonda un complejo de ácido nucleico que comprende (a) una molécula de ácido nucleico que comprende (i) una primera región de anclaje a la marca a la cual se hibrida una primera molécula de ARN, a cuya primera molécula de ARN están unidos (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal; (ii) una segunda región de anclaje a la marca a la cual se hibrida una segunda molécula de ARN, a cuya segunda molécula de ARN están unidos (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que

constituye una segunda señal; y (b) una secuencia específica de la diana anclada covalentemente a la molécula de ácido nucleico, donde la primera y la segunda moléculas de ARN tienen al menos 20 nucleótidos, donde la secuencia específica de la diana se une a la molécula diana, cuya molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc, y donde cuando dicha sonda está unida a su molécula diana, la identidad de la primera y la segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica la molécula diana. La primera y la segunda moléculas de ARN tienen cada una preferiblemente al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 nucleótidos.

Adicionalmente, los autores de la presente invención describen una sonda, siendo dicha sonda un complejo de ácido nucleico que comprende (a) una molécula de ácido nucleico sintética que comprende (i) una primera región de anclaje a la marca a la cual se hibrida una primera molécula de ARN, a cuya primera molécula de ARN están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal; (ii) una segunda región de anclaje a la marca a la cual se hibrida una segunda molécula de ARN, a cuya segunda molécula de ARN están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal; y (b) una secuencia específica de la diana anclada covalentemente a la molécula de ácido nucleico sintética, donde la primera y la segunda moléculas de ARN tienen cada una al menos 50 nucleótidos, donde la secuencia específica de la diana se une a una molécula diana, cuya molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc, y donde cuando dicha sonda se une a su molécula diana, la identidad de la primera y segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica la molécula diana.

También se describe en la presente memoria una sonda, siendo dicha sonda un complejo de ácido nucleico que comprende: (a) una molécula de ácido nucleico que comprende (i) una primera región de anclaje a la marca a la cual se hibrida una primera molécula de ARN, a cuya primera molécula de ARN están anclados covalentemente uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal; (ii) una segunda región de anclaje a la marca a la que se hibrida una segunda molécula de ARN, a cuya segunda molécula de ARN están anclados covalentemente uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal; y (b) una secuencia específica de la diana anclada covalentemente a la molécula de ácido nucleico, donde la primera y la segunda moléculas de ARN tienen cada una al menos 50 nucleótidos, donde la secuencia específica de la diana se une a una molécula diana, cuya molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc, y donde cuando dicha sonda está unida a su molécula diana, la identidad de la primera y la segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí constituyen al menos parte del código que identifica la molécula diana.

En ciertos aspectos de la presente invención, los monómeros marcadores están anclados a las regiones de anclaje de los nanoinformadores de la invención por medio de uno o más parches de ARN, o moléculas de ARN. Tales parches de ARN tienen cada uno preferiblemente de alrededor (+/- 5%) de 100 a alrededor de 3.000 nucleótidos cada uno, más preferiblemente alrededor de 500 a alrededor de 1.500 nucleótidos cada uno.

La etiqueta de afinidad se puede anclar a un parche y, en un nanoinformador dual, la etiqueta de afinidad puede estar anclada a uno o más parches sobre uno o ambos componentes del par de sondas.

La etiqueta de afinidad se puede anclar siendo anclada covalentemente a un oligonucleótido hibridado a uno o más parches en un nanoinformador. Alternativamente, la etiqueta de afinidad se puede anclar a la molécula de ácido nucleico que es el almacén de un nanoinformador.

También se describen en la presente memoria complejos de nanoinformador-molécula diana. Opcionalmente, uno o más componentes de los complejos de nanoinformador están anclados covalentemente a una etiqueta de afinidad para la purificación y/o la inmovilización (ya sea antes o después del estiramiento, como se describe en la Sección 5,12 más abajo). Alternativamente, la propia molécula diana está anclada a una etiqueta de afinidad. Por ejemplo, cuando la molécula diana es un ácido nucleico, la etiqueta de afinidad puede ser biotina que es incorporada al ácido nucleico en forma de nucleótidos modificados con biotina. La molécula diana se puede inmovilizar por medio de una etiqueta de afinidad antes o después de la formación del complejo de nanoinformador-molécula diana. Cuando la etiqueta de afinidad es un radical de biotina, la molécula diana se puede inmovilizar sobre una superficie sólida que está recubierta con avidina o estreptavidina.

Uno o todos los componentes (p. ej., almacén, secuencia específica de la diana) de un nanoinformador pueden ser (o tener la secuencia de) una molécula de origen natural. No obstante, el nanoinformador completamente ensamblado y marcado es generalmente una molécula sintética, por ejemplo una molécula química elaborada reuniendo secuencias de origen natural (p. ej., un almacén viral o basado en plásmidos y una secuencia específica de la diana de mamífero) y/o secuencias artificiales.

Preferiblemente se forman imágenes de los nanoinformadores de la invención, cuando forman complejos con sus moléculas diana, cuando están inmovilizados y estirados. Los nanoinformadores y los complejos que comprenden los nanoinformadores y las moléculas diana pueden ser inmovilizados mediante cualquier método conocido en la técnica. Preferiblemente, el nanoinformador está anclado a una etiqueta de afinidad (p. ej., biotina o digoxigenina)

que se puede utilizar para trabar el nanoinformador a una superficie que contiene un ligando para la etiqueta de afinidad (p. ej., estreptavidina o un anticuerpo anti-digoxigenina, respectivamente). El nanoinformador inmovilizado puede ser estirado por medio de cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a estiramiento por flujo, una técnica de menisco en retracción, electroestiramiento, constricción en el flujo de un líquido que contiene el nanoinformador junto con un campo eléctrico oscilante.

Los autores de la presente invención también describen en la presente memoria poblaciones de diez o más nanoinformadores, o sondas, comprendiendo cada sonda una molécula sintética, comprendiendo dicha molécula sintética, sucesivamente en el siguiente orden: (a) una primera región de anclaje a la marca a la cual están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal; (b) una segunda región de anclaje a la marca a la cual están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal; (c) una tercera región de anclaje a la marca a la cual están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y (d) una secuencia específica de la diana que se une a una molécula diana; donde la primera y la segunda señales son distinguibles espectralmente; donde la segunda y la tercera señales son distinguibles espectralmente; donde la primera y la segunda señales no se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dichas primera, segunda y tercera señales; donde la segunda y la tercera señales no se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dichas primera, segunda y tercera señales; donde la primera y la tercera señales se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dichas primera, segunda y tercera señales; donde cada sonda comprende una secuencia específica de la diana que se une a una molécula diana diferente; y donde las identidades de la primera, la segunda y la tercera señales y la localización de la primera y la tercera señales relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica cada molécula diana.

Preferiblemente, la molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc.

También preferiblemente, las regiones de anclaje a la marca y las secuencias específicas de la diana son secuencias de nucleótidos predeterminadas.

En ciertos aspectos de la invención, los pares de sondas de la invención son purificados.

En ciertas realizaciones específicas, los monómeros marcadores anclados a la primera región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye dicha primera señal; donde los monómeros marcadores anclados a la segunda región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la segunda señal; y los monómeros marcadores anclados a la tercera región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la tercera señal. De este modo, en tales realizaciones, los monómeros marcadores anclados a una región de anclaje a la marca concreta emiten luz a la misma o a las mismas longitudes de onda.

En otras realizaciones específicas, al menos una de la primera señal, la segunda señal, y la tercera señal comprende luz a una pluralidad de longitudes de onda diferentes. En tales realizaciones, dos o más monómeros anclados a al menos una región de anclaje a la marca emiten luz a diferentes longitudes de onda.

Los autores de la presente invención también describen en la presente memoria una población de diez o más complejos de nanoinformador-molécula diana, comprendiendo cada complejo una molécula sintética unida a una molécula diana, comprendiendo dicha molécula sintética, sucesivamente en el siguiente orden: (a) una primera región de anclaje a la marca a la cual están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal; (b) una segunda región de anclaje a la marca a la cual están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal; (c) una tercera región de anclaje a la marca a la cual están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y (d) una secuencia específica de la diana que se une a dicha molécula diana; donde la primera y la segunda señales son distinguibles espectralmente; donde la segunda y la tercera señales son distinguibles espectralmente; donde la primera y la segunda señales no se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dicha primera, dicha segunda y dicha tercera señales; donde la segunda y la tercera señales no se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dicha primera, segunda y tercera señales; donde la primera y la tercera señales se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dicha primera, segunda y tercera señales; donde cada secuencia específica de la diana (o, en un nanoinformador dual, par de secuencias específicas de la diana) se une a una de dichas moléculas diana diferentes; y donde las identidades de la primera, segunda y tercera señales y las localizaciones de la primera y la tercera señales relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica cada molécula diana.

Opcionalmente, la población se inmoviliza en una superficie sólida, y preferiblemente se estira. Por ejemplo, se puede someter la población a estiramiento de flujo, una técnica de menisco en retracción, electroestiramiento, o constricción en el flujo de un líquido que contiene dichos complejos junto con un campo eléctrico oscilante.

La presente invención proporciona además métodos de detección de una molécula diana, comprendiendo dichos métodos: (a) poner en contacto una muestra biomolecular con un par de sondas de acuerdo con la invención en condiciones que permiten la unión de la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana a la molécula diana y (b) detectar el código que identifica una molécula diana.

5 Preferiblemente, la sonda y la molécula diana son ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones específicas, los monómeros marcadores anclados a la primera región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, los monómeros marcadores anclados a la segunda región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, y los monómeros marcadores anclados a la tercera región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda. En dicha realización, cada una de la primera señal, la segunda señal y la tercera señal consiste en  
10 luz a una única longitud de onda.

En otras realizaciones, al menos una de la primera señal, la segunda señal, y la tercera señal comprende luz a una pluralidad de longitudes de onda diferentes.

Los autores de la presente invención también describen una molécula de ácido nucleico artificial que comprende una o más regiones sintéticas (en adelante, "Región"), teniendo cada Región al menos 50 nucleótidos y comprendiendo  
15 una base repetida regularmente, teniendo dicha base repetida regularmente una periodicidad de cuatro a veinticinco, de manera que dicho tipo de base aparece a intervalos regulares de cada cuarta a cada vigésimo quinta posición en dicha región. En una realización específica, no más de 5% de dicha base en dicha Región aparece a otros intervalos regulares distintos del mencionado. El ácido nucleico artificial puede ser un ácido nucleico de hebra sencilla (p. ej., útil como almacén del nanoinformador) o al menos parcialmente (o completamente) de doble hebra (p. ej., un  
20 almacén del nanoinformador al cual se hibridan parches). El ácido nucleico artificial puede ser ARN, ADN, o un híbrido ADN/ARN. Preferiblemente la base repetida regularmente es una timidina o un uracilo. En realizaciones específicas, la periodicidad de la base repetida regularmente en dichas una o más Regiones es de alrededor de 6 a alrededor de 15; alternativamente, la periodicidad de la base repetida regularmente en dichas una o más Regiones es de alrededor de 8 a alrededor de 12.

25 Preferiblemente, el ácido nucleico artificial comprende una pluralidad de Regiones, por ejemplo de alrededor de 2 a alrededor de 50 Regiones, o de alrededor de 3 a alrededor de 10 Regiones.

La pluralidad de Regiones pueden ser inmediatamente adyacentes entre sí, o estar separadas por una o más regiones espaciadoras. Las regiones espaciadoras pueden incluir, por ejemplo, una o más secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción (o el complemento de las mismas) y/o una o más secuencias  
30 promotoras de ARN polimerasa (o el complemento de las mismas).

Opcionalmente, la pluralidad de Regiones difieren entre sí en la secuencia.

El ácido nucleico artificial puede comprender adicionalmente un origen de replicación.

Preferiblemente, el contenido de GC de las una o más Regiones es de alrededor de 25% a alrededor de 75%, más preferiblemente de alrededor de 40 a alrededor de 60%, y muy preferiblemente es de alrededor de 50% (+/- 5%).

35 Cada una de dichas una o más Regiones de los ácidos nucleicos artificiales de la invención tiene preferiblemente de alrededor de 50 a alrededor de 50.000 bases de longitud, y tiene más preferiblemente de alrededor de 200 a alrededor de 2.000 bases de longitud.

Los ácidos nucleicos artificiales descritos en la presente memoria tienen preferiblemente de alrededor de 50 a  
40 alrededor de 100.000 bases de longitud, y tienen más preferiblemente de alrededor de 200 a alrededor de 10.000 o de alrededor de 500 a alrededor de 20.000 bases de longitud.

Los ácidos nucleicos artificiales descritos en la presente memoria pueden comprender una o una pluralidad de Regiones, que son útiles como regiones de anclaje a la marca. Cuando un ácido nucleico artificial comprende una pluralidad de Regiones, el tipo de base repetida regularmente puede ser el mismo en la pluralidad de Regiones, o diferente. Asimismo, la periodicidad de la base repetida regularmente puede ser la misma en la pluralidad de  
45 Regiones, o diferente. Los autores de la presente invención describen por lo tanto un ácido nucleico artificial que comprende una pluralidad de Regiones, en las que tanto el tipo como la periodicidad de la base repetida regularmente son los mismos en la pluralidad de Regiones.

Los ácidos nucleicos artificiales descritos en la presente memoria pueden comprender además una secuencia específica de la diana.

50 Preferiblemente, las Regiones no comprenden un sitio de reconocimiento para endonucleótidos de restricción que realizan al menos 6 cortes, tales como una de las siguientes endonucleasas de restricción: BamHI, EcoRI, PstI, SmaI, XbaI, NotI, SacI, EcoRV, HindIII, ClaI, Sall, XhoI, ApaI o KpnI. En una realización específica, las Regiones no comprenden ningún sitio de reconocimiento para enzimas que realizan 6 cortes, o enzimas que realizan al menos 6 cortes que se utilizan para la clonación dentro del ácido nucleico artificial, por ejemplo enzimas que realizan 6 cortes  
55 presentes en el poliligador de un plásmido o en regiones que flanquean las Regiones.



Preferiblemente se pronostica por medio del soporte lógico MFOLD que los ácidos nucleicos artificiales o al menos las Regiones de éstos, no contienen bucles en horquilla.

5 Preferiblemente, los ácidos nucleicos artificiales o al menos las Regiones de estos no tienen repeticiones directas o invertidas que sean mayores de 12 bases de longitud. Alternativamente, los ácidos nucleicos artificiales y/o las Regiones no tienen repeticiones directas o invertidas que sean mayores de alrededor de 11, alrededor de 10 o alrededor de 9 bases de longitud.

Los ácidos nucleicos artificiales preferiblemente comprenden una secuencia promotora (tal como T7, T3 o SP6) o su complemento.

Los ácidos nucleicos artificiales pueden comprender adicionalmente una secuencia de encapsidación de fagos.

10 Las Regiones de los ácidos nucleicos artificiales pueden estar flanqueadas por sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción.

15 Los ácidos nucleicos artificiales se pueden utilizar como armazones de nanoinformadores, en los que las Regiones son útiles como regiones de anclaje a marcas. Por consiguiente, los autores de la presente invención describen un ácido nucleico artificial que comprende una o más Regiones, estando anclada la base repetida regularmente de dichas una o más Regiones a al menos un monómero marcador emisor de luz. Al menos una base repetida regularmente puede ser anclada covalentemente al monómero marcador, o puede ser anclada al monómero marcador por medio de hibridación a otro ácido nucleico al cual está anclado covalentemente el monómero marcador. Opcionalmente, al menos dos Regiones diferentes están ancladas a un monómero marcador emisor de luz diferente.

20 Los ácidos nucleicos artificiales pueden comprender adicionalmente una etiqueta de afinidad y/o un origen de replicación.

25 Opcionalmente, un ácido nucleico artificial es una molécula parcialmente o totalmente de doble hebra en la que una hebra es ADN al cual se hibridan una pluralidad de ARN, comprendiendo cada ARN una única región en la que la base repetida regularmente es uracilo modificado con aminoalilo. Opcionalmente, al menos 50% de las apariciones de dicho uracilo modificado con aminoalilo están ancladas covalentemente a al menos un monómero marcador emisor de luz; en otras realizaciones, el porcentaje de apariciones es al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98%. Este porcentaje de apariciones se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica.

30 Como se comenta en otra parte, los nanoinformadores de la invención pueden comprender armazones de ácido nucleico que están anclados a parches y, opcionalmente, alas. Los detalles de tales estructuras se comentan en la Sección 5.3, más abajo, y las estructuras ilustrativas de parches y alas se representan en la Figura 7.

35 La presente invención proporciona adicionalmente métodos de detección de una pluralidad de moléculas diana, comprendiendo dichos métodos: (a) poner en contacto una muestra biomolecular que puede contener la molécula diana con una población de pares de sondas de acuerdo con la invención en condiciones que permiten la unión de la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana de cada par de sondas a sus respectivas moléculas diana, donde cada par de sondas de dicha población cuando se une a su respectiva molécula diana está asociado con un código distinguible; y (b) detectar los códigos que identifican la pluralidad de moléculas diana.

40 En ciertos aspectos, el nanoinformador de los métodos es una molécula sintética que comprende: (i) una primera región de anclaje a la marca a la que están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal, siendo todas dichas primeras señales la misma; (ii) una segunda región de anclaje a la marca a la que están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal, siendo todas dichas segundas señales la misma; (iii) una tercera región de anclaje a la marca a la que están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una  
45 tercera señal, siendo todas dichas terceras señales la misma; donde cada región de anclaje comprende una pluralidad de pares de parches; donde la primera y segunda señales son distinguibles espectralmente; donde la segunda y tercera señales son distinguibles espectralmente, y determinar si está presente y/o se produce o no el código del nanoinformador comprende b) detectar dichas primera, segunda y tercera señales en condiciones: donde la primera y segunda señales no se pueden resolver espacialmente; donde la segunda y tercera señales no se  
50 pueden resolver espacialmente; donde la primera y tercera señales se pueden resolver espacialmente en dichas condiciones; y donde las identidades de la primera, segunda y tercera señales y las localizaciones de la primera y la tercera señales relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica una molécula diana. De ese modo, se detecta la molécula diana.

#### 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

55 FIGURA 1A-1F: La Figura 1A ilustra un nanoinformador dual con un código de nanoinformador en la posición 16, que utiliza dos componentes nanoinformadores de la posición 8. La Figura 1B ilustra un nanoinformador dual con un

código de nanoinformador en la posición 9, que utiliza un componente de nanoinformador en la posición 8 y un componente de nanoinformador en una única posición. La Figura 1 C ilustra un nanoinformador dual con un código de nanoinformador en la posición 8, que utiliza una sonda fantasma y un componente de nanoinformador en la posición 8. La Figura 1D ilustra un único nanoinformador con un código de nanoinformador en la posición 8. En las Figuras 1A-11 D, la forma de estrella (representada con una flecha) es ilustrativa.....

se comentan en la Sección 5.3, más abajo, y las estructuras de parche y ala ilustrativas se representan en la Figura 7.

La presente invención proporciona adicionalmente métodos de detección de una molécula diana, comprendiendo dichos métodos: (a) poner en contacto una muestra biomolecular que puede contener la molécula diana con cualquiera de las estructuras nanoinformadoras descritas en la presente memoria en condiciones que permiten la unión de la molécula sintética a la molécula diana, (b) someter a las condiciones que permitan la formación y/o detección del código del nanoinformador y (c) determinar si se produce o está presente o no el código del nanoinformador, detectando de ese modo dicha molécula diana.

En ciertos aspectos de la invención, el nanoinformador de los métodos es una molécula sintética que comprende: (i) una primera región de anclaje a la marca a la cual están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal, siendo todas dichas primeras señales la misma; (ii) una segunda región de anclaje a la marca a la que están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal, siendo todas dichas segundas señales la misma; (iii) una tercera región de anclaje a la marca a la cual están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal, siendo todas las terceras señales la misma; donde cada región de anclaje comprende una pluralidad de pares de parches; donde la primera y segunda señales son distinguibles espectralmente; donde la segunda y tercera señales son distinguibles espectralmente, y determinar si está presente o se ha producido o no el código del nanoinformador comprende (b) detectar dichas primera, segunda y tercera señales en las condiciones: donde la primera y segunda señales no se pueden resolver espacialmente; donde la segunda y tercera señales no se pueden resolver espacialmente; donde la primera y tercera señales se pueden resolver espacialmente en dichas condiciones; y donde las identidades de la primera, segunda y tercera señales y las localizaciones de la primera y tercera señales relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica una molécula diana. De ese modo, se detecta la molécula.

#### 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1A-1F: Figura 1A ilustra un nanoinformador dual con un código de nanoinformador en la posición 16, que utiliza dos componentes nanoinformadores de la posición 8. La Figura 1B ilustra un nanoinformador dual con un código nanoinformador en la posición 9, que utiliza un componente nanoinformador en la posición 8 y un componente nanoinformador en una única posición. La Figura 1 C ilustra un nanoinformador dual con un código nanoinformador en la posición 8, que utiliza una sonda fantasma y un componente nanoinformador en la posición 8. La Figura 1D ilustra un único nanoinformador con un código nanoinformador en la posición 8. En las Figuras 1A-11 D, la forma de estrella (representada con una flecha) es ilustrativa.....de una etiqueta de afinidad, que se puede utilizar para purificar el nanoinformador (o un complejo de nanoinformador-molécula diana) para la formación de imágenes. La región numerada de la Figura 1A-1D hace referencia a regiones de anclaje a la marca separadas. Todas excepto la posición 12 de la Figura 1A se marcan con uno a cuatro tipos de monómeros marcadores, representados como diagramas de "soles" grises, blancos, rayados o con tiras. La posición 12 de la Figura 1A es una "mancha oscura" no marcada. Las Figuras 1E y 1F representan variaciones en los nanoinformadores de las Figuras 1B y 1D, respectivamente, en las que la molécula diana a la cual se unen los nanoinformadores comprende radicales de biotina (mostrados en forma de pequeños asteriscos), por ejemplo nucleótidos modificados con biotina incorporados al azar a un ácido nucleico diana. Los propios nanoinformadores comprenden opcionalmente una etiqueta de afinidad (no mostrado).

FIGURA 2A-2C: La Figura 2A muestra una ilustración de una unidad marcadora de un nanoinformador, que contiene un armazón con unidades de parche y las correspondientes alas divididas dispuestas a lo largo de su longitud. La Figura 2B ilustra los componentes de un único par de parches y su correspondiente ala, que contiene 1: una porción de un armazón de nanoinformador (p. ej., ADN de hebra sencilla de M13); 2: Un par de parches; 3: un par de alas divididas; y 4: oligonucleótidos marcados, cada uno con un monómero marcador incorporado, hibridados al ala dividida. La Figura 2C muestra un nanoinformador con 4 "manchas", cada mancha diseñada para que contenga 9 pares de parches de 60-65 nucleótidos, cada uno anclado a un par de alas divididas de 95-100 nucleótidos. Cada par de alas divididas tenía un sitio de unión para 12 oligonucleótidos cada uno anclado a un único monómero marcador. Cada mancha por lo tanto tenía sitios de unión para 108 monómeros marcadores.

FIGURA 3: Un nanoinformador en el que los parches son segmentos de ARN se pueden utilizar con (Figura 3A) y sin (Figura 3B) registros. Tanto la Figura 3A como la 3B representan un (1) armazón de nanoinformador (línea negra gruesa) al cual están anclados (2) 8 segmentos de ARN (líneas grises gruesas 1-8), (3) una secuencia específica de la diana (línea discontinua "T") y (4) un oligonucleótido (línea de cuadros "O") que es parcialmente complementario al armazón y parcialmente complementario a la secuencia diana específica. Este oligonucleótido es referido como oligonucleótido "ligador". En la Figura 3A, solamente un registro, esto es, cada segmento de ARN alterno se marca.

Las posiciones del segundo registro sirven como "espaciadores", haciendo posible generar un código de nanoinformador en el que las posiciones consecutivas del código son del mismo "color," o no distinguibles espectralmente. En la Figura 3B, ambos registros, esto es, segmentos de ARN adyacentes sin espaciadores intermedios, se marcan, sin que ninguno de los vecinos más próximos tenga el mismo "color."

5 FIGURA 4: Es una imagen de un nanoinformador dual hibridado a una molécula diana. Aquí, ambos registros están marcados. Los nanoinformadores se marcan con tres colores diferentes, Alexa 488, Cy3 y Alexa 647 (marcados 1, 2 y 3, respectivamente). Los corchetes de la izquierda muestran una sonda del nanoinformador dual y los corchetes de la derecha muestran la otra sonda del nanoinformador dual. Los colores 1, 2 y 3 fueron adquiridos cada uno en diferentes canales y el primer y segundo registros, observados como filas de manchas, fueron aumentados en un  
10 grado mediante varios píxeles para poder mostrar cada registro individualmente.

FIGURA 5A-5D: Esta figura ilustra los diversos componentes de los nanoinformadores duales mostrados en la Figura 4. La Figura 5A ilustra un color (aquí, Alexa 488, representado en la columna de la izquierda en forma de círculos vacíos), que es distinguible espectralmente de Cy3 (mostrado en la Figura 5B, representado en la columna de la izquierda como círculos rayados verticalmente) y Alexa 647 (mostrado en la Figura 5C en forma de círculos rayados diagonalmente). Las imágenes obtenidas de cada uno fueron superpuestas para generar la Figura 5D.  
15

FIGURA 6A-6E: La Figura 6A es una ilustración esquemática del experimento mostrado en las Figuras 6B y 6C. En este caso, la estrella representa la biotina que se utilizó para anclar el complejo por un extremo a la superficie antes del estiramiento. Las Figuras 6B y 6C muestran imágenes de experimentos en los que la sonda fantasma S2-A, el nanoinformador marcado S2-B y el ADN diana S2 (Figura 6B) o el ARN diana S2 (Figura 6C) fueron hibridados. La  
20 Figura 6E muestra un primer plano de los complejos de nanoinformador de la Figura 6B, conteniendo cada uno una sonda fantasma S2-A, un nanoinformador marcado S2-B y un ADN diana S2. La Figura 6D muestra una imagen de un experimento de control negativo, en el que se hibridaron una sonda fantasma S2-A, un nanoinformador marcado S2-B y ningún ARN diana S2.

FIGURA 7A-G. Las Figuras 7A, 7B, 7C y 7D representan diferentes permutaciones de los parches en un armazón de nanoinformador, las Figuras 7E y 7F representan diferentes permutaciones de alas divididas en un armazón de nanoinformador, opcionalmente hibridado a uno o más oligonucleótidos, como en la Figura 7G. En la Figura 7A-G,  $\alpha$  hace referencia a una molécula 5' o 3' o a un extremo de una molécula,  $\beta$  hace referencia a una molécula 3' o 5' o a un extremo de una molécula correspondientes.  
25

FIGURA 8: La Figura 8 representa un esquema en el que el fago M13 de hebra sencilla se linealiza para su uso como armazón del nanoinformador. El fago M13 circular se recuece a un exceso de cinco veces de oligonucleótido de corte BamHI (líneas sombreadas) (1), y el M13 parcialmente de doble hebra resultante se digiere con la endonucleasa de restricción BamHI (2), dando como resultado un M13 linealizado en el que el oligonucleótido de corte BamHI todavía está anclado (3). Este complejo de M13-oligonucleótido se calienta en presencia de un exceso de oligonucleótido complementario al oligonucleótido de corte BamHI (un "anti-oligonucleótido BamHI") (líneas grises) (4). El oligonucleótido de corte BamHI se recuece al exceso del anti-oligonucleótido BamHI, y la molécula de M13 se purifica del oligonucleótido, por ejemplo utilizando columnas de exclusión por tamaños, para producir el armazón de M13.  
30  
35

FIGURA 9A-9B: Muestra un nanoinformador marcado con una etiqueta de afinidad en cada extremo, A1 y A2. En la Figura 9, el nanoinformador marcado se inmoviliza poro medio de la unión de A1 a un compañero de afinidad inmovilizado. En ausencia de un compañero de unión por afinidad para A2, el extremo A2 del nanoinformador permanece en solución (Figura 9A), pero en presencia de un compañero de unión por afinidad (A2'), el extremo A2 del nanoinformador también es inmovilizado (Figura 9B). Tras la inmovilización, el nanoinformador se puede estirar, o "elongar" como se representa en la Figura 9B, por ejemplo mediante electroestiramiento, para la separación de las regiones de anclaje a la marca de una manera que permita la detección del código del nanoinformador.  
40

FIGURA 10A-10C: La Figura 10A muestra un nanoinformador marcado que contiene una única etiqueta de afinidad, A1. Se puede anclar otra etiqueta de afinidad, A2, al nanoinformador mediante unión directa del nanoinformador a una molécula que contiene A2 (p. ej., si el nanoinformador es o comprende un ácido nucleico, puede hibridar directamente con otro ácido nucleico al cual está anclado A2), como se representa en la Figura 10B. Alternativamente, la segunda etiqueta de afinidad, A2, puede estar anclada al nanoinformador marcado por medio de una molécula formadora de puente, tal como el ácido nucleico formador de puente ("X") representado en la Figura 10C.  
45  
50

FIGURA 11A-11B: Muestra un nanoinformador marcado (basado en un ácido nucleico) con una etiqueta de afinidad, A1, en un extremo. En la Figura 11, el nanoinformador marcado se inmoviliza por medio de la unión de A1 a un compañero de afinidad inmovilizado. El otro extremo del nanoinformador está en solución (Figura 11A), pero puede ser inmovilizado mediante hibridación a un oligonucleótido complementario que contiene otra etiqueta de afinidad (A2) utilizada para inmovilizar el nanoinformador (Figura 11B). A1 y A2 pueden ser iguales, por ejemplo biotina, para la inmovilización sobre una superficie recubierta con avidina o estreptavidina. Tras la inmovilización de A1, el nanoinformador puede ser estirado, o "elongado" como se representa en la Figura 11, por ejemplo mediante electroestiramiento, para la separación de las regiones de anclaje a la marca de una manera que permita la  
55

detección del código del nanoinformador. Opcionalmente, mientras el nanoinformador está en estado elongado, A2 se introduce y se une al extremo del nanoinformador que es complementario a A2 bajo la superficie.

5 FIGURA 12A-12B. La Figura 12A proporciona una ilustración de un nanoinformador que comprende una primera porción inmovilizada F1; y la Figura 12B proporciona una ilustración de un nanoinformador estirado en un campo eléctrico y que comprende una primera porción F1 inmovilizada y una segunda porción F2 inmovilizada, donde F2 está inmovilizada por medio de un complejo con la molécula F3.

10 FIGURA 13A-13C. La Figura 13A proporciona una ilustración de un complejo de tres miembros para la inmovilización de un nanoinformador estirado; la FIG. 13B proporciona una ilustración de un complejo de dos miembros para la inmovilización de un nanoinformador estirado; y la FIG. 13C proporciona una ilustración de un complejo incompleto para la inmovilización de un nanoinformador estirado.

15 FIGURA 14A-14D. La Figura 14A proporciona una ilustración de un nanoinformador que comprende una primera porción inmovilizada F1; la FIG. 14B proporciona una ilustración de un nanoinformador estirado inmovilizado en la primera porción F1 y en una segunda porción por medio de complejos con F2; la FIG. 14C proporciona una ilustración de un nanoinformador que comprende una primera porción inmovilizada a una superficie de avidina a través de biotina; y la FIG. 14D proporciona una ilustración de un nanoinformador estirado inmovilizado en una primera porción y en una segunda porción por medio de una unión selectiva de biotina a una superficie de avidina.

FIGURA 15A-15C. La Figura 15A ilustra la inmovilización de un extremo de una molécula de ADN en un dispositivo microfluídico; la Figura 15B ilustra el estiramiento del ADN en un campo eléctrico; y la Figura 15C ilustra la inmovilización selectiva de un segundo extremo de la molécula de ADN estirada.

20 FIGURA 16 proporciona una imagen de nanoinformadores estirados inmovilizados selectivamente mediante los métodos de la presente invención.

FIGURA 17 representa la relación entre el número de regiones de anclaje a la marca con respecto al umbral de entrelazamiento calculado para los nanoinformadores para tamaños de la región de anclaje a la marca de 900 pb a 1100 pb.

25 FIGURA 18 es un gráfico de dispersión que muestra los valores de la señal log2 normalizado y promedio para cada muestra positiva (n=3) para los 509 genes cuya expresión se midió en un análisis multiplexado de nanoinformadores como se describe en el Ejemplo 9 (Sección 14) más abajo.

## 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 En la presente memoria se describen nanoinformadores, y su fabricación y uso. Un nanoinformador completamente ensamblado y marcado comprende dos porciones principales, una secuencia específica de la diana que es capaz de unirse a una molécula diana, y una región marcada que emite un "código" de señales (el "código del nanoinformador") asociado con la secuencia específica de la diana. Después de la unión del nanoinformador a la molécula diana, el código del nanoinformador identifica la molécula diana a la cual se une el nanoinformador.

35 Los nanoinformadores son estructuras modulares. Generalmente, un nanoinformador es una entidad molecular que contiene tres elementos básicos: un armazón que contiene dos o más regiones de anclaje a la marca, uno o más parches anclados al armazón, y una secuencia específica de la diana, también anclada al armazón. Los elementos de un nanoinformador se pueden encontrar en una única entidad molecular (un "nanoinformador singular"), o dos entidades moleculares distintas (un nanoinformador "dual"). Cada entidad molecular puede estar compuesta por una molécula o más de una molécula anclada a otra mediante métodos covalentes o no covalentes. Generalmente, cada  
40 componente de un nanoinformador dual tiene una secuencia específica de la diana que se une a un sitio diferente en la misma molécula diana. Esto permite componentes del nanoinformador más pequeños con cinéticas de unión del nanoinformador a la molécula diana más eficaces y mejores proporciones señal:ruido resultantes de la mayor especificidad de unión.

45 Los parches anclados a un armazón de nanoinformador sirven para anclar los monómeros marcadores a un armazón de nanoinformador. Los parches pueden estar marcados directamente, por ejemplo mediante incorporación covalente de uno o más monómeros marcadores a los parches de ácido nucleico. Alternativamente, los parches pueden estar anclados a las alas, que pueden estar marcadas directamente, por ejemplo mediante la incorporación covalente de uno o más monómeros marcadores a un ala de ácido nucleico, o indirectamente, por ejemplo mediante hibridación de un ala de ácido nucleico a un oligonucleótido que está anclado covalentemente a uno o más  
50 monómeros marcadores. Cuando los monómeros marcadores anclados a una región de anclaje a la marca no se incorporan directamente al parche o al ala, el parche o el ala sirven como "puente" entre el monómero marcador y la región de anclaje a la marca, y pueden ser referidos como "molécula formadora de puente", p. ej., un ácido nucleico formador de puente.

55 Adicionalmente los nanoinformadores pueden tener etiquetas de afinidad para la purificación y/o para la inmovilización (por ejemplo a una superficie sólida). Los nanoinformadores, o los complejos de nanoinformador-molécula diana, son purificados preferiblemente en dos o más etapas de selección por afinidad. Por ejemplo, en un

nanoinformador dual, una sonda puede comprender una primera etiqueta de afinidad y la otra sonda puede comprender una segunda (diferente) etiqueta de afinidad. Las sondas se mezclan con moléculas diana, y los complejos que comprenden las dos sondas del nanoinformador dual se separan de los materiales no unidos (p. ej., la diana o las sondas individuales del nanoinformador) mediante purificación por afinidad frente a una o ambas etiquetas de afinidad individuales. En la primera etapa, la mezcla se puede unir a un reactivo de afinidad para la primera etiqueta de afinidad, de manera que solamente se purifican las sondas que comprenden la primera etiqueta de afinidad y los complejos deseados. Los materiales unidos se liberan del primer reactivo de afinidad y opcionalmente se unen a un reactivo de afinidad para la segunda etiqueta de afinidad, permitiendo la separación de los complejos de las sondas que comprenden la primera etiqueta de afinidad. En este punto solamente se unirían los complejos completos. Los complejos son liberados finalmente de los reactivos de afinidad para la segunda etiqueta de afinidad y después preferiblemente se estiran y se forma su imagen. El reactivo de afinidad puede ser cualquier superficie sólida recubierta con un compañero de unión para la etiqueta de afinidad, tal como una columna, cuenta (p. ej., cuenta de látex o magnética) o portaobjetos recubierto con el compañero de unión. La inmovilización y el estiramiento de los nanoinformadores utilizando reactivos de afinidad se describen con detalle en el documento US2010-0261026 A1.

Un nanoinformador y un complejo de nanoinformador-diana que tiene o comprende ácidos nucleicos puede ser purificado por afinidad o inmovilizado utilizando un ácido nucleico, tal como un oligonucleótido, que es complementario a al menos parte del nanoinformador o la diana. En una aplicación específica en la que la diana incluye un tramo de poli A o poli dA, el complejo de nanoinformador-diana puede ser purificado o inmovilizado por medio de un reactivo de afinidad recubierto con un oligonucleótido de poli dT.

La secuencia de señales emitidas por los monómeros marcadores asociados con las diferentes regiones de anclaje a la marca del armazón de un nanoinformador dado permite la única identificación del nanoinformador. Un nanoinformador que tiene una única identidad o una firma espectral única está asociado con una secuencia específica de la diana que reconoce una molécula diana específica o una de sus porciones. Cuando un nanoinformador se expone a una mezcla que contiene la molécula diana en condiciones que permiten la unión de la secuencia o las secuencias específicas de la diana del nanoinformador a la molécula diana, la secuencia o las secuencias específicas de la diana se unen preferentemente a la molécula diana. La detección del código espectral asociado con el nanoinformador permite la detección de la presencia de la molécula diana en la mezcla (análisis cualitativo). El recuento de los monómeros marcadores asociados con un código o firma espectral dados permite el recuento de todas las moléculas de la mezcla asociadas con la secuencia específica de la diana acoplada al nanoinformador (análisis cuantitativo). Los nanoinformadores son de este modo útiles para la diagnosis o la prognosis de diferentes estados biológicos (p. ej., sano vs. enfermo) por medio del análisis cualitativo de marcadores biológicos conocidos. Por otra parte, la exquisita sensibilidad de detección y cuantificación de una única molécula proporcionada por los nanoinformadores de la invención permite la identificación de nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos, incluyendo aquellos cuyas fluctuaciones entre los diferentes estados biológicos son demasiado ligeras para detectar una correlación con un estado biológico concreto utilizando métodos moleculares tradicionales. La sensibilidad de la detección molecular basada en nanoinformadores permite un análisis farmacocinético detallado de los agentes terapéuticos y diagnósticos en pequeñas muestras biológicas.

Muchos nanoinformadores, referidos como nanoinformadores singulares están compuestos por una entidad molecular, como se representa en la Figura 1D. No obstante, para incrementar la especificidad de un nanoinformador y/o para mejorar la cinética de su unión a una molécula diana, un nanoinformador preferido es un nanoinformador compuesto por dos entidades moleculares, que contienen cada una, una secuencia específica de la diana diferente que se une a una región diferente de la misma molécula diana. Se representan diversas realizaciones de nanoinformadores duales en las Figuras 1A-1C. En un nanoinformador dual, al menos una de las dos entidades moleculares está marcada. La otra entidad molecular no está necesariamente marcada. Tales componentes no marcados de los nanoinformadores duales son referidos en la presente memoria como "sondas fantasma" (véase la Figura 1C) y a menudo tienen etiquetas de afinidad ancladas, lo que resulta útil para inmovilizar y/o estirar el complejo que contiene el nanoinformador dual y la molécula diana para permitir la visualización y/o formación de imágenes del complejo.

Debido a sus estructuras modulares, los nanoinformadores se pueden ensamblar y marcar de varias maneras diferentes. Por ejemplo, un armazón de nanoinformador puede estar anclado a una secuencia específica de la diana (por ejemplo mediante hibridación y, opcionalmente, ligación), y la estructura que comprende el armazón y la secuencia específica de la diana anclada a uno o más parches y, cuando se desee, alas. Alternativamente, el armazón del nanoinformador puede anclarse primero a uno o más parches (y, opcionalmente, alas), y la estructura de armazón/parche anclarse después a una secuencia específica de la diana. De este modo, a menos que se establezca de otro modo, una discusión o enumeración de las etapas de ensamblaje del nanoinformador no implica que se deba seguir una ruta de ensamblaje específica.

El ensamblaje y uso del nanoinformador se ilustran en la presente memoria en gran parte por medio de la descripción de una variedad de nanoinformadores basados en ácido nucleicos; sin embargo, un experto en la técnica reconocería que los métodos descritos en la presente memoria son aplicables a un nanoinformador basado en aminoácidos (o basado en ácidos nucleicos/aminoácidos híbrido). Las realizaciones ilustrativas de los nanoinformadores parcialmente y completamente ensamblados se enumeran más abajo.

En su aspecto más simple, un armazón tiene al menos dos regiones de anclaje a la marca susceptibles de ser marcadas y resueltas. El armazón puede ser cualquier entidad molecular que permita la formación de regiones de anclaje a la marca sobre el armazón que pueden ser marcadas y resueltas por separado. El número de regiones de anclaje a la marca que se va a formar sobre un armazón se basa en la longitud y la naturaleza del armazón, de los métodos de marcaje del nanoinformador, como también del tipo de monómeros marcadores que emiten la señal que se va a anclar a las regiones de anclaje a la marca del armazón. Un nanoinformador puede tener un armazón que incluye dos o más regiones de anclaje a la marca. Las estructuras de armazón adecuadas incluyen armazones basados en ADN.

Los autores de la presente invención también describen nanoinformadores marcados en los que una o más regiones de anclaje a la marca están ancladas a los correspondientes monómeros marcadores, emitiendo cada monómero marcador una señal. Por ejemplo, se obtiene un nanoinformador marcado de acuerdo con la invención cuando al menos dos monómeros marcadores están anclados a dos regiones de anclaje a la marca correspondientes del armazón, de manera que estas regiones de anclaje a la marca marcadas, o "manchas", son distinguibles. Los monómeros marcadores que emiten una señal asociada con diferentes regiones de anclaje a la marca del armazón pueden emitir señales que son espectralmente indistinguibles en las condiciones de detección (señales "similares"), o pueden emitir señales que son distinguibles espectralmente, al menos en las condiciones de detección (p. ej., cuando el nanoinformador es inmovilizado, estirado y observado al microscopio).

Los autores de la presente invención también describen un nanoinformador donde dos o más monómeros marcadores están anclados a una región de anclaje a la marca. La señal emitida por los monómeros marcadores asociados a dicha región de anclaje a la marca produce una señal agregada que es detectada. Esta señal agregada producida puede estar compuesta por señales similares o compuesta por al menos dos señales distinguibles espectralmente.

Adicionalmente, los autores de la presente invención describen un nanoinformador donde al menos dos monómeros marcadores que emiten señales similares están anclados a dos regiones de anclaje a la marca correspondientes del armazón y dichos dos monómeros marcadores son espacialmente distinguibles. Los autores de la presente invención también describen un nanoinformador donde al menos dos monómeros marcadores que emiten dos señales distinguibles están anclados a dos regiones de anclaje a la marca contiguas, por ejemplo dos regiones de anclaje a la marca adyacentes, por medio de las cuales dichos al menos dos monómeros marcadores son distinguibles espectralmente.

Los autores de la presente invención describen un nanoinformador donde dos manchas que emiten señales similares están separadas por una región espaciadora, por medio de la cual la interposición de la región espaciadora permite la resolución o una mejor resolución de dichas señales similares emitidas por los monómeros marcadores anclados a dichas dos manchas. Opcionalmente, las regiones espaciadoras tienen una longitud determinada por la resolución de un aparato empleado en la detección del nanoinformador.

Asimismo se describe en la presente memoria un nanoinformador con una o más "manchas dobles". Cada mancha doble contiene dos o más (p. ej., tres, cuatro o cinco) manchas adyacentes que emiten señales similares sin estar separadas por una región espaciadora. Las manchas dobles pueden ser identificadas por sus tamaños.

Un monómero marcador que emite una señal se puede anclar covalentemente o no covalentemente (p. ej., por medio de hibridación) a un parche que está anclado a la región de anclaje a la marca. Los monómeros marcadores también pueden ser anclados covalentemente o no covalentemente (p. ej., por medio de hibridación) a un ala anclada a un parche que a su vez está anclado al armazón. El ala puede estar formada por una molécula o por dos o más moléculas ("partes del ala") que forman un ala dividida.

Los autores de la presente invención también describen un nanoinformador asociado con un código espectral determinado por la secuencia de señales emitida por los monómeros marcadores anclados (p. ej., indirectamente a través de un parche) a regiones de anclaje a la marca sobre el armazón del nanoinformador, por medio de las cuales la detección del código espectral permite la identificación del nanoinformador.

Adicionalmente, los autores de la presente invención describen un nuevo nanoinformador que comprende una etiqueta de afinidad anclada al armazón del nanoinformador, de manera que el anclaje de la etiqueta de afinidad a un soporte permite el estiramiento del armazón y la resolución de las señales emitidas por los monómeros marcadores correspondientes a diferentes regiones de anclaje a la marca sobre el armazón. El estiramiento del nanoinformador puede implicar cualquier método de estiramiento conocido en la técnica incluyendo pero no limitado a, métodos que implican métodos físicos, hidrodinámicos o eléctricos.

Los autores de la presente invención describen adicionalmente un nuevo nanoinformador que comprende alas ancladas a las regiones de anclaje a la marca del armazón, donde un ala anclada a una región de anclaje a la marca del armazón ancla el correspondiente monómero marcador a dicha región de anclaje a la marca, anclando indirectamente de ese modo los monómeros marcadores a las correspondientes regiones de anclaje a la marca sobre dicho armazón. Opcionalmente, cada monómero marcador comprende una porción emisora de señal y una porción de oligonucleótido de secuencia predeterminada, y las alas comprenden repeticiones de una secuencia del

ala complementaria a la porción de oligonucleótido de una marca correspondiente, por medio de lo cual uno o más monómeros marcadores se anclan a una región de anclaje a la marca correspondiente por medio de hibridación de dichas porciones de oligonucleótido de dichos monómeros marcadores a dichas repeticiones de dicha secuencia del ala produciendo de ese modo un nanoinformador marcado.

- 5 Un nanoinformador puede incluir adicionalmente una secuencia específica de la diana acoplada al armazón. La secuencia específica de la diana se selecciona para permitir que el nanoinformador reconozca, se una o se ancle a una molécula diana. Los nanoinformadores descritos en la presente memoria son adecuados para la identificación de moléculas diana de todos los tipos. Por ejemplo, se pueden acoplar secuencias específicas de la diana apropiadas al armazón del nanoinformador para permitir la detección de una molécula diana. Preferiblemente la  
10 molécula diana es ADN (incluyendo ADNc), ARN (incluyendo ARNm y ARNc), un péptido, un polipéptido, o una proteína.

- Una realización de la invención proporciona un aumento de la flexibilidad en la detección de la molécula diana con monómeros marcadores. En esta realización, un nanoinformador dual (o par de sondas) que comprende dos  
15 entidades moleculares diferentes, cada una con una región específica de la diana separada, al menos una de las cuales está marcada, se une a la misma molécula diana. De este modo, las secuencias específicas de la diana de los dos componentes del nanoinformador dual se unen a diferentes porciones de una molécula diana seleccionada, por medio de lo cual la detección del código espectral asociado con el nanoinformador dual proporciona la detección de la molécula diana seleccionada en una muestra biomolecular puesta en contacto con dicho nanoinformador dual.

- La invención también proporciona un método de detección de la presencia de una molécula diana específica en una  
20 muestra biomolecular que comprende: (i) poner en contacto dicha muestra con un nanoinformador dual (o par de sondas) de acuerdo con la invención en condiciones que permiten la unión de las secuencias específicas de la diana del nanoinformador dual a la molécula diana y (ii) detectar el código que identifica la molécula diana. Dependiendo de la arquitectura del nanoinformador, el nanoinformador dual puede ser marcado antes o después de la unión a la molécula diana.

- En ciertas realizaciones, los métodos de detección se llevan a cabo en análisis múltiple, por medio de los cuales se detectan una pluralidad de moléculas diana en el mismo análisis (una única mezcla de reacción). En una realización preferida, el análisis es un análisis de hibridación en el que una pluralidad de moléculas diana se detectan simultáneamente. En ciertas realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas en el mismo análisis es de al  
25 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 análisis 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 está en cualquier intervalo entre los anteriores números de moléculas diana diferentes, tales como, pero no limitados a, de 20 a 50 moléculas diana diferentes, de 50 a 200 moléculas diana diferentes, de 100 a 1000 moléculas diana diferentes, de 500 a 5000 moléculas diana diferentes, etcétera.  
30  
35  
40

En ciertas realizaciones, la invención está dirigida a la detección de diferentes formas de empalme del mismo ARN. Las diferentes formas de empalme se pueden detectar utilizando una pluralidad de sondas nanoinformadoras, cada una con una secuencia específica de la diana diferente complementaria a un exón diferente del mismo gen.

- La estabilidad estructural de un nanoinformador se puede incrementar por medio de la ligación de parches y,  
45 opcionalmente, la ligación de alas divididas y/o los oligonucleótidos marcados hibridados a las alas divididas.

- Además de las capacidades analíticas cualitativas proporcionadas por los nanoinformadores de la invención y de las técnicas analíticas basadas en ellos, los nanoinformadores de la invención son adecuados únicamente para llevar a cabo análisis cuantitativos. Al proporcionar una unión uno a uno entre los nanoinformadores (ya sean nanoinformadores singulares o duales) de la invención y sus moléculas diana en una muestra biomolecular, todas o  
50 una porción representativa de las moléculas diana presentes en la muestra pueden ser identificadas y sometidas a recuento. Este recuento individual de las diversas especies moleculares proporciona un método exacto y directo para determinar la concentración absoluta o relativa de la molécula diana en la muestra biomolecular. Por otra parte, la capacidad para dirigirse a cada molécula de la mezcla individualmente potencia los beneficios de la miniaturización incluyendo una elevada sensibilidad, requerimientos de cantidades mínimas de muestra, elevadas velocidades de reacción que son permitidas por la cinética en fase de disolución en un pequeño volumen, y por  
55 último costes de reactivos muy bajos.

Como se apreciará a partir de la descripción y de los ejemplos proporcionados más abajo, la presente invención proporciona numerosas ventajas. Por ejemplo, la modularidad del complejo al formar los nanoinformadores de acuerdo con la invención permite la creación sistemática de genotecas de nanoinformadores únicos que tienen un

grado de diversidad muy elevado (*p. ej.*, millones de nanoinformadores reconocibles de manera individualizada). Esta modularidad permite flexibilidad en la adaptación según los requisitos del cliente de las poblaciones de nanoinformadores a las aplicaciones específicas que a su vez proporcionan eficacias de fabricación significativas. Otra ventaja que se apreciará a través de la siguiente descripción proviene de la flexibilidad en el ensamblaje de los nanoinformadores de la invención. Esto es, debido a su estructura modular, los nanoinformadores de la invención se pueden ensamblar antes del envío a un punto de utilización o ensamblarse en el punto de utilización.

### 5.1 NOMENCLATURA DE NANOINFORMADORES

NANOINFORMADOR: El término "nanoinformador" hace referencia a una entidad molecular que tiene (i) una molécula ("armazón") que contiene al menos dos regiones de anclaje a la marca; (ii) al menos un parche anclado a al menos una región de anclaje a la marca; y (iii) una secuencia específica de la diana. Como se describe con detalle más abajo, los nanoinformadores pueden ser nanoinformadores singulares (estando todos los componentes en una única entidad molecular) o nanoinformadores duales (estando todos los componentes en dos entidades moleculares separadas). Los nanoinformadores son preferiblemente sintéticos, esto es, moléculas de origen no natural, por ejemplo son moléculas químicas elaboradas uniendo dos o más secuencias artificiales y/o de origen natural que existen normalmente en más de una molécula (*p. ej.*, plásmido, cromosoma, genoma viral, proteína, etc.).

NANOINFORMADOR MARCADO: Un nanoinformador marcado es un nanoinformador en el que al menos un parche del nanoinformador está anclado a uno o más monómeros marcadores que generan una señal que forma al menos parte del código del nanoinformador.

UNIDAD DE MARCAJE: El término "unidad de marcaje" hace referencia a las porciones no específicas de la diana de un nanoinformador marcado.

SONDA: Esto hace referencia a una molécula que tiene una secuencia específica de la diana. En el contexto de un nanoinformador singular, el término "sonda" hace referencia al propio nanoinformador; en el contexto de un nanoinformador dual, el término "sonda" hace referencia a uno o ambos de los dos componentes del nanoinformador.

PAR DE SONDAS: Esto hace referencia a un nanoinformador dual.

PARCHE: El término "parche" hace referencia a una entidad molecular anclada a la región de anclaje a la marca del armazón del nanoinformador, generalmente con el propósito de marcar el nanoinformador. El parche puede tener uno o más monómeros marcadores anclados o bien directamente (covalentemente o no covalentemente) o bien indirectamente a él, ya sea antes o después de su anclaje al armazón.

ALA: El término "ala" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una entidad molecular anclada a un parche o par de parches anclados a una región de anclaje a la marca. El ala es una o más moléculas que contienen monómeros marcadores o capaces de unirse a una o más moléculas que contienen monómeros marcadores. Al proporcionar el marcaje indirecto de las regiones, las alas proporcionan más flexibilidad en el control del número de monómeros que emiten señales asociados con una región así como la naturaleza de esos monómeros. Las alas pueden estar formadas por una única pieza molecular o por varias piezas moleculares (*p. ej.*, dos piezas) formando un "ala dividida" (véase, *p. ej.*, la Figura 7)

SECUENCIA ESPECÍFICA DE LA DIANA: El término "secuencia específica de la diana" hace referencia a una entidad molecular que es capaz de unirse a una molécula diana. En el contexto de un nanoinformador, la secuencia específica de la diana está anclada al armazón del nanoinformador. La molécula diana es preferiblemente (pero no necesariamente) una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc.

SONDA FANTASMA: Una molécula que comprende una secuencia específica de la diana, pero que no está marcada con un monómero marcador que emite una señal que contribuye al código del nanoinformador.

SONDA INFORMADORA: Una molécula que comprende una secuencia específica de la diana que está marcada con al menos un monómero marcador que emite una señal que contribuye al código del nanoinformador. Un nanoinformador singular es una sonda informadora, ya que es un componente marcado de un nanoinformador dual.

GANCHO F Y GANCHO G: En el contexto de un nanoinformador dual, los ganchos F y G son cada uno una etiqueta de afinidad que es capaz de ser unida selectivamente a una de las sondas. En realizaciones preferidas, el gancho F y el gancho G son oligonucleótidos biotinilados que son hibridables a las respectivas secuencias complementarias presentes en (*p. ej.*, por medio de ligación) o ancladas a (*p. ej.*, por medio de hibridación) a las respectivas sondas del nanoinformador en un nanoinformador dual. De este modo, los ganchos F y los ganchos G se pueden utilizar para la purificación, inmovilización y estiramiento del nanoinformador. Generalmente, cuando un nanoinformador dual contiene una sonda informadora y una sonda fantasma, el gancho G se ancla a la sonda informadora y el gancho F se ancla a la sonda fantasma. Los ganchos F y los ganchos G se pueden biotinilar terminalmente o internamente. También se pueden modificar con amina para permitir el anclaje a un sustrato sólido para su purificación por afinidad.



5 ETIQUETA F Y ETIQUETA G: Secuencias repetidas en tándem de alrededor de 10 a alrededor de 25 nucleótidos que son complementarias al gancho F y al gancho G, respectivamente. Las etiquetas G y las etiquetas F están ancladas a las sondas del nanoinformador. Generalmente, una etiqueta F está presente en o anclada a una sonda fantasma por medio de una secuencia ligadora y una etiqueta G está presente en o anclada al armazón de la sonda informadora por medio de una secuencia ligadora.

10 MANCHA: Una mancha, en el contexto de la detección por nanoinformadores, es la señal del producto agregado detectada a partir de los monómeros marcadores anclados a un sitio de anclaje a la marca individual en un nanoinformador, y que, dependiendo del tamaño de la región de anclaje a la marca y de la naturaleza (p. ej., longitud de onda de emisión primaria) del monómero marcador, puede aparecer como una única fuente puntual de luz cuando se visualiza al microscopio. Las manchas de un nanoinformador pueden ser solapantes o no solapantes. El código del nanoinformador que identifica esa molécula diana puede comprender cualquier permutación de la longitud de la mancha, su posición relativa con respecto a otras manchas, y/o la naturaleza (p. ej., longitudes de onda de emisión primarias) de su señal. Generalmente, para cada sonda o par de sondas de la invención, las regiones de anclaje a la marca adyacentes son no solapantes, y/o las manchas de las regiones de anclaje a la marca adyacentes son distinguibles espacialmente y/o espectralmente, al menos en las condiciones de detección (p. ej., cuando el nanoinformador es inmovilizado, estirado y observado al microscopio, como se describe en la presente memoria).

15 Ocasionalmente, se hace referencia a un "tamaño" de la mancha como un cierto número de bases o nucleótidos. Como comprendería fácilmente un experto en la técnica, esto hace referencia al número de bases o nucleótidos de la correspondiente región de anclaje a la marca.

20 CÓDIGO DEL NANOINFORMADOR: El orden y la naturaleza (p. ej., longitudes de onda de emisión primarias, opcionalmente también longitud) de las manchas de un nanoinformador sirven como un código del nanoinformador que identifica la molécula diana capaz de ser unida por el nanoinformador a través de las secuencias específicas de la diana del nanoinformador. Cuando el nanoinformador está unido a una molécula diana, el código del nanoinformador también identifica la molécula diana. Opcionalmente, la longitud de una mancha puede ser un componente del código del nanoinformador.

25 MANCHA OSCURA: El término "mancha oscura" hace referencia a una carencia de señal, o "mancha", de un sitio de anclaje a la marca sobre un nanoinformador. Las manchas oscuras se pueden incorporar al código del nanoinformador para añadir más permutaciones codificantes y generar mayor diversidad de nanoinformadores en una población de nanoinformadores.

30 REGISTRO: El término "registro" hace referencia a un conjunto de regiones de anclaje a la marca alternantes.

## 5.2 EL ARMAZÓN DEL NANOINFORMADOR

35 El armazón del nanoinformador puede ser cualquier entidad molecular, más preferiblemente una molécula de ácido nucleico, que contiene regiones de anclaje a la marca a las cuales se pueden anclar directamente o indirectamente monómeros marcadores. En una realización, el armazón del nanoinformador es un armazón de proteína; en una realización preferida, el armazón del nanoinformador es un armazón de ácido nucleico en el que las regiones de anclaje a la marca son regiones de hebra sencilla a las cuales se pueden anclar mediante hibridación otros ácidos nucleicos, tales como parches de oligonucleótidos, parches de ARN, o parches de ADN. En realizaciones específicas, el armazón del nanoinformador es una molécula de ácido nucleico.

40 No existen limitaciones concretas sobre los tipos de armazones que son adecuados para formar los nanoinformadores. Un armazón puede tener esencialmente cualquier estructura incluyendo, por ejemplo, un armazón lineal de hebra sencilla, un armazón lineal de doble hebra, un armazón circular de hebra sencilla o un armazón circular de doble hebra. Los ejemplos de las estructuras de armazón incluyen, por ejemplo, un armazón formado por una entidad molecular tal como polipéptidos, ácidos nucleicos o carbohidratos. Un armazón también puede incluir una combinación de estructuras, por ejemplo, un armazón puede estar formado por uno o más tramos de polipéptidos acoplados a uno o más tramos de carbohidratos.

45 Las entidades moleculares adecuadas para los armazones de acuerdo con la invención incluyen estructuras poliméricas concretamente estructuras poliméricas basadas en ácidos nucleicos tales como ADN. Las estructuras basadas en ADN ofrecen numerosas ventajas en el contexto de la presente invención debido al menos en parte al vasto universo de técnicas y metodologías existentes que permiten la manipulación de los constructos de ADN.

50 Como se ha indicado más arriba, el armazón puede ser de hebra sencilla o de doble hebra. El armazón de doble hebra puede ser cualquier ADN de doble hebra convencional o una doble hebra que esté compuesta de un tramo de hebra sencilla lineal de ácido nucleico con unidades de parche o parches planos anclados.

Un armazón puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-100 regiones de anclaje a la marca o más.

55 Las regiones de anclaje a la marca de un armazón de nanoinformador variarán de tamaño dependiendo del método de marcaje. En varias realizaciones, una región de anclaje a la marca puede tener cualquier longitud entre 10 nm y

10.000 nm, pero tiene más preferiblemente de 50 nm a 5.000 nm, y más preferiblemente de 100 nm a 1.000 nm. En varias realizaciones, la región de anclaje a la marca es de alrededor de 100 nm a alrededor de 500 nm, de alrededor de 150 nm a alrededor de 450 nm, de alrededor de 200 nm a alrededor de 400 nm, o de 250 a alrededor de 350 nm. En una realización preferida, la región de anclaje a la marca corresponde íntimamente al tamaño de una mancha de difracción limitada, esto es, la mancha más pequeña que se puede detectar con la óptica convencional, que es de alrededor de 300 nm.

Cuando el almacén es un ácido nucleico, 1 nm corresponde a aproximadamente 3 nucleótidos; de este modo, una región de anclaje a la marca de aproximadamente 300 nm corresponde a aproximadamente 900 bases. En otras realizaciones preferidas, la región de anclaje a la marca es de alrededor de 300 nucleótidos a alrededor de 1,5 kb, de alrededor de 450 nucleótidos a alrededor de 1,35 kb, de alrededor de 0,6 kb a alrededor de 1,2 kb, o de 0,75 kb a alrededor de 1,05 kb.

Un ejemplo ilustrativo de una entidad molecular para un almacén de nanoinformador de acuerdo con la invención es el ADN de M13, que es de hebra sencilla. En una realización, el almacén del nanoinformador es un ADN circular al menos parcialmente de hebra sencilla, tal como M13 circular. En una realización más preferida, el almacén del nanoinformador es ADN lineal al menos parcialmente de hebra sencilla, tal como M13 lineal. En una realización específica, el ADN de hebra sencilla de M13 obtenido realizando un corte en el sitio BamHI del ADN de M13 circular. Se debe observar que en el contexto de la presente invención, el ADN lineal proporciona ventajas adicionales en comparación con el ADN circular. Una ventaja de utilizar ADN lineal en la formación de un almacén de acuerdo con la invención hace referencia a la tensión torsional significativamente reducida asociada al ADN lineal. La tensión torsional añadida asociada al ADN circular puede interferir en la integridad estructural del almacén tras la adición al almacén de otros componentes del nanoinformador, tales como unidades de parche. Una tensión torsional severa puede conducir a la rotura de la estructura del almacén.

Se debe observar no obstante que los nanoinformadores en los que solo unos pocos sitios de anclaje a la marca están marcados, puede ser adecuado ADN circular.

## 5.2.1 ALMACÉN DE NANOINFORMADOR SINTÉTICO NOVEDOSO

### SECUENCIAS

La presente invención emplea almacenes de nanoinformadores que son moléculas de ácido nucleico artificiales (ADN/ARN, o híbridos de ADN/ARN) diseñadas para que tengan características que optimicen el marcaje y la detección del nanoinformador. En estos aspectos de la invención, un almacén de nanoinformador es un ácido nucleico artificial que comprende una o más secuencias sintéticas de 50 a 50.000 bases de longitud. Por consiguiente, el almacén del nanoinformador, que es preferiblemente un ADN, se diseña para que tenga una o más Regiones, útiles como regiones de anclaje a la marca, que comprende un patrón regular de una base concreta (la "base repetida regularmente"). En tales regiones, la base repetida regularmente aparece con una periodicidad de cada  $n$  residuos, donde  $n$  es cualquier número, y preferiblemente de 4 a 25.

Preferiblemente, no más del 25% de las bases repetidas regularmente en una Región aparece en un intervalo distinto de dichos intervalos regulares. Por ejemplo, si en una Región de 100 nucleótidos existen 12 bases de timidina, y la timidina es la base repetida regularmente, en este aspecto de la invención no más del 25% de estas, esto es, 3 bases de timidina, aparecen fuera del patrón regular de timidinas. En realizaciones específicas, no más de 20%, no más de 15%, no más de 10%, no más de 9%, no más de 8%, no más de 7%, no más de 6%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2% o no más de 1% de dichas bases aparecen en otros intervalos distintos de dichos intervalos regulares en dicha región.

La base repetida regularmente en las Regiones de un almacén de nanoinformador, o su base repetida regularmente complementaria en un parche recocado (o segmento) se puede utilizar para anclar los monómeros marcadores, preferiblemente monómeros marcadores emisores de luz, al nanoinformador en un patrón espaciado uniformemente, regular para una mejor distribución de la señal del nanoinformador. Preferiblemente, cuando una Región está marcada, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de apariciones de la base repetida regularmente están ancladas a al menos un monómero marcador emisor de luz, ya sea mediante un anclaje covalente de un monómero marcador a una base, o mediante hibridación a un ácido nucleico en el que los complementos de la base repetida regularmente están marcadas así.

Este porcentaje de apariciones se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica. En un método, la cantidad de ácido nucleico producido en una reacción de marcaje se purifica (por ejemplo, se puede purificar ARN utilizando un kit Qiagen RNeasy) y se somete a espectrofotometría UV. La absorbancia ("A") a las longitudes de onda apropiadas se mide para cada uno del ácido nucleico (260 nm) y el monómero marcador cuya aparición se va a medir (p. ej., 495 nm para Alexa Fluor 488; 590 nm para Alexa Fluor 594; 650 para Alexa Fluor 647; y 550 nm para Cy3). La absorbancia del ácido nucleico se corrige ajustando el valor de la absorbancia a 260 nm ("A<sub>260</sub>") para eliminar la contribución del "ruido" del monómero marcador restando la absorbancia en la longitud de onda pico para el monómero marcador (A<sub>LM</sub>) menos el factor de corrección para ese monómero marcador. Cuando el ácido nucleico es ARN, el número de monómeros marcadores por mil nucleótidos se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{\text{núm. de monómeros marcadores}}{1000 \text{ nucleótidos}} = \frac{A_{LM}}{A_{LM}} \times \frac{9010}{CE_{LM}} \times 1000$$

5 donde  $CE_{LM}$  es el coeficiente de extinción para el monómero marcador. A partir de esta fórmula, se puede calcular el porcentaje de apariciones de la bases repetidas regularmente que están ancladas al monómero marcador emisor de luz.

10 Generalmente, la base repetida regularmente preferida en una región de anclaje a la marca es la timidina, de manera que la región puede ser marcada por hibridación a uno o más parches complementarios (p. ej., segmentos de ARN) en los que la base repetida regularmente es la uridina. Esto permite el uso de UTP modificados con aminoalilo, que son fácilmente asequibles comercialmente, como sitios de anclaje al monómero marcador, en una secuencia por lo demás al azar. Preferiblemente, además de la periodicidad regular de las Regiones, las regiones (y el ácido nucleico que las comprende) contienen una estructura secundaria mínima. El contenido de GC global se mantiene preferiblemente próximo a 50%, y es preferiblemente constante a lo largo de tramos relativamente cortos para hacer similares las  $T_m$  locales.

15 Los ácidos nucleicos artificiales de la invención, o al menos las Regiones de estos, preferiblemente no tienen repeticiones directas o invertidas que sean mayores de 12 bases de longitud. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos artificiales y/o las Regiones no tienen repeticiones directas o invertidas que sean mayores de alrededor de 11, alrededor de 10 o alrededor de 9 bases de longitud.

20 En una Región ilustrativa en la que el nucleótido repetido regularmente es una timidina y el contenido de GC es aproximadamente 50%, las adeninas en exceso compensarían la pérdida de abundancia de T. Para generar la secuencia seleccionada, se crean secuencias al azar con patrones fijos de T que oscilan de cada 4ª base a cada 25ª base y se escrutan para minimizar la presencia de repeticiones invertidas y directas.

25 Las secuencias también se escrutan preferiblemente para evitar los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción que cortan seis bases comunes. Las secuencias seleccionadas se someten adicionalmente a análisis de la estructura secundaria pronosticada, y aquellas con la mínima estructura secundaria se seleccionan para una evaluación adicional. Se puede utilizar cualquier soporte lógico conocido en la técnica para pronosticar la estructura secundaria, tal como el soporte lógico MFOLD (Zuker, 2003, Nucleic Acids Res. 31 (13):3406-15; Mathews et al., 1999, J. Mol. Biol. 288:911-940).

30 Una secuencia apropiada se divide en regiones de anclaje a la marca que oscilan de 50 bases a 2 kilobases de longitud (podría ser más larga). Cada región de anclaje a la marca es una secuencia única, pero contiene un número constante y un espaciamiento de las T con respecto a las otras regiones de anclaje a la marca en una secuencia informadora dada. Estas regiones de anclaje a la marca se pueden intercalar con otras regiones cuya secuencia no importa. Las regiones de anclaje a la marca sintéticas de un armazón del nanoinformador pueden tener diferentes longitudes y/o tener diferentes bases repetidas regularmente. Se puede añadir una secuencia de inicio optimizada para la transcripción por la ARN polimerasa de T7, T3, o SP6 (comenzando en la posición +1 del transcrito) al extremo 5' de cada región de anclaje a la marca. Opcionalmente se añaden sitios de restricción en los límites de cada región de anclaje a la marca para permitir una adición o delección específica de regiones de anclaje a la marca individuales a la secuencia utilizando técnicas de clonación convencionales. El número de regiones de anclaje a la marca sintéticas de un nanoinformador oscila preferiblemente de 1 a 50. En otras realizaciones más, el número de regiones de anclaje a la marca sintéticas en un nanoinformador oscila de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 regiones de anclaje a la marca sintéticas a 15, 20, 30, 40, o 50 regiones de anclaje a la marca sintéticas, o cualquier intervalo intermedio.

45 Un ejemplo de dicha región de anclaje a la marca sintética novedosa se proporciona más abajo. En esta secuencia, mostrada de 5' a 3', las T están remplazadas cada 8ª posición y la región está limitada por un sitio de restricción Sac I 5' y un sitio de restricción Kpn I 3'. Se incluye un sitio de inicio del transcrito optimizado para la polimerasa de T7 (GGGAGA) en el extremo 5' de la región, aguas abajo del sitio de restricción 5'. El complemento de esta secuencia, cuando se genera en forma de una hebra sencilla forma el armazón para la molécula de ARN transcrita a partir de esta región de anclaje a la marca.

GAGCTCGGGAGATGGCGAGCTGGAAGCATCAGAAAAGTAGGAAGATGACAAAAT  
 AGGGCCATAGAAGCATGAAGAAGCTGAACGCATGAGACAATAGGAAGCTACGCC  
 ACTAGGGACCTGAGAAGCTGAGCGGCTCAGCGGGTCCGAGCGTCAAAAAATAA  
 AAGAGTGAAAACAATAGACGAATGACCGCGTAAAACCATCCAGAAGTAAACGGG  
 TACAAACATACAGAGATAGCCACCTGGACCAATAGGCACGTACAAACGTACAA  
 GCCTGGCGCGATGAGGCAATCCACACGTGCAGAGCTGGAACAATGGAAAGATG  
 CAAGAATAAACCGATACCGGGATCGAGGGCTCAGCGAATAAAGCAGTCAACAA  
 CTGGAAGATCCACACATACCGGCGTAACCGAGTCCAAACATACAGACCTGCA  
 AGACTCGCGACATGGGACGGTAAAACCATCCGACCGTAAACCGGTAACCAGGT  
 AGCCGGGTAAAACATAGCAGGGTGGAGACCTCAGAACGTAAAGACGTCCAAG  
 GGTGCGCGGATAGCGAACTACCGCATCGCCCAATGGGCCAATCAACAGATAA  
 ACGAGTAGAAAAGTCAGAAAATAAGAACTAACGAAATACGAGGGTCCAAGG  
 ATGCAAGACTGAGGCCCTAAGGAGATAAGGAAATAGGCCGATGCAGACCTGAA  
 ACGATGCACCGATCCGACGGTAAAAGACTAGACACGTAGCCGGATCAGGGCT  
 GGGAGGCTGGAACCGTGAGCACATAGCAAAGTCGCAGCGTCGGCAGATCCGCC  
 GGTAAAAAAGTAGAGGCATGACCGGATGGGCAAATAGCGACGTACAGCAGTGA  
 AGCACTAAAAGCATCCAAGGGTAGGAGACTAGGCGCCTCGACGGGTAGGTACC

Los ácidos nucleicos sintéticos empleados en la presente invención se pueden sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos diferentemente modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre la región de anclaje a la marca y los parches o segmentos recodados, p. ej., se pueden utilizar derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de los nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar el ácido nucleico sintético incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.

Alternativamente, el ácido nucleico sintético puede ser producido biológicamente utilizando un vector en el que se ha subclonado un ácido nucleico.

En diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico sintético que se pueden emplear en la invención pueden ser modificadas en el radical de la base, el radical del azúcar o la cadena principal de fosfato para mejorar, p. ej., la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la cadena principal de desoxirribosa fosfato de los ácidos nucleicos se puede modificar para generar ácidos péptidonucleicos (véase Hyrup et al., 1996, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 4(1):5-23). Según se utiliza en la presente memoria, los términos "ácidos péptidonucleicos" o "PNA" hace referencia a un mimético de ácido nucleico, p. ej., un mimético de ADN, en el que la cadena principal de desoxirribosa fosfato es remplazada por una cadena principal de pseudopéptido y solamente se conservan las cuatro nucleobases naturales. Se ha demostrado que la cadena principal neutra de los PNA permite la hibridación específica al ADN y ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA se puede realizar utilizando protocolos de síntesis peptídica en fase sólida convencionales como describen Hyrup et al., 1996, en *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 4(1): 5-23; Perry-O'Keefe et al, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675.

En una realización ilustrativa, se puede construir la secuencia sintética novedosa seleccionada sintéticamente en forma de un ADN de doble hebra por medio de una compañía de síntesis de genes comercial y se puede clonar de una manera orientada en el interior de un "fagémido", un vector plasmídico que contiene una región intergénica (IG) de un fago M13 o f1 que contiene las secuencias que actúan en cis necesarias para la replicación del ADN y la encapsidación del fago, tal como pUC119. La orientación apropiada del inserto clonado con respecto al origen de replicación del fago permite la generación de un armazón de ADN de hebra sencilla que es el complemento inverso de las moléculas de ARN generadas mediante la transcripción in vitro para cada región de anclaje a la marca.

5 Con el fin de generar el almacén de ADN de hebra sencilla del informador novedoso, el fagémido se transforma en una cepa de E. coli que contiene un episoma F'. La posterior infección de la bacteria transformada con un fago coadyuvante tal como el mutante K07 de M13 da como resultado la secreción del fagémido que porta la secuencia informadora novedosa en forma de un fago empaquetado de hebra sencilla a partir del cual se prepara el ADN de hebra sencilla circular utilizando un protocolo normalizado. Este ADN se linealiza y la porción del vector se separa por corte recociendo oligonucleótidos complementarios cortos a cualquier extremo de la secuencia informadora novedosa para generar sitios de restricción de doble hebra, seguido de tratamiento con las enzimas de restricción apropiadas.

10 Para elaborar moléculas de ARN (parches o "segmentos") para cada región de anclaje a la marca, se diseñan cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") para generar un molde de doble hebra que comienza con el promotor de la ARN polimerasa (T7, T3, o SP6) directamente aguas arriba (5') del sitio de inicio de la transcripción y terminando después del sitio para la enzima de restricción 3'. Utilizando este molde, se realiza la transcripción *in vitro* de las moléculas de ARN en presencia de una base repetida regularmente modificada con aminoalilo en el ARN (*p. ej.*, UTP ) y otras bases no modificadas (*p. ej.*, ATP, CTP y GTP). Esto conduce a un ARN  
15 producto en el que cada base repetida regularmente (*p. ej.*, U) es modificada para permitir el acoplamiento covalente de un monómero marcador en esa posición de la molécula de ARN.

El acoplamiento de los monómeros marcadores emisores de luz a las moléculas de ARN y el recocido de las moléculas de ARN marcadas al almacén se lleva a cabo como se describe más abajo.

Algunas consideraciones del diseño para la secuencia de novo se enumeran en la Tabla 1 de más abajo.

Rasgo del Almacén Sintético	Ventajas
Secuencia sintética novedosa	Puede tener cualquier longitud y se puede diseñar para que incorpore cualquier rasgo de secuencia deseado incluyendo pero no limitado a aquellos enumerados en esta tabla.
Estructura secundaria mínima (seleccionar frente a repeticiones invertidas)	Permite la transcripción coherente de moléculas de ARN completas. Permite el recocido coherente de las moléculas de ARN al almacén a temperaturas predecibles. Minimiza el auto-recocido y/o el recocido cruzado entre moléculas de ARN o almacenes.
Secuencias repetidas mínimas	Evita el recocido erróneo entre las moléculas de ARN y regiones inapropiadas del almacén.
Sitios de restricción únicos en las fronteras de las regiones de anclaje a la marca	Permite la adición y delección de regiones de anclaje a la marca individuales utilizando técnicas de clonación molecular convencionales.
Espaciamiento uniforme, definido de las T y transcripción con UTP modificado con aminoalilo (UTP no modificado)	Controla el número de sitios de acoplamiento para los monómeros de cada región de anclaje a la marca, permitiendo una luminosidad consistente de las moléculas de ARN marcadas individuales. Controla la distancia entre monómeros: se puede optimizar el espaciamiento para evitar el impedimento estérico y la extinción de la fluorescencia.
Secuencia de inicio optimizado para la transcripción mediante ARN polimerasa de T7, T3, o SP6	Promueve la transcripción eficaz <i>in vitro</i> de cada región de anclaje a la marca.

20 **5.3 PARCHES**

Los monómeros marcadores que emiten señales que constituyen todo o parte del código del nanoinformador están anclados a la región o a las regiones de anclaje a la marca del almacén del nanoinformador a través de una estructura referida en la presente memoria como "parche". Los monómeros marcadores puede estar anclados

directamente (*p. ej.*, covalentemente o no covalentemente) a un parche, o anclados indirectamente a un parche (*p. ej.*, por medio de hibridación).

5 Los parches de ácido nucleico pueden tener de 25 nucleótidos a varias kilobases (*p. ej.*, 5 kb) de longitud, y tienen preferiblemente de 50 nucleótidos a 2 kb de longitud. En realizaciones específicas, los parches de ácido nucleico tienen aproximadamente de 25 a 250, de 50 a 200, de 50 a 150, o de 50 a 100 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, los parches de ácido nucleico tienen aproximadamente de 500 a 2.000, de 500 a 1.500, de 500 a 1.000, de 750 a 1.250, o de 750 a 1.000 nucleótidos de longitud. Los parches de ácido nucleico pueden ser parches de ARN o parches de ADN.

10 Un monómero marcador puede ser anclado covalentemente a un parche antes o después de que el parche sea anclado a la región de anclaje a la marca de un armazón de nanoinformador. Por ejemplo, cuando el parche es una molécula de ácido nucleico, la marca puede ser anclada covalentemente mediante incorporación de un nucleótido que contiene un monómero marcador al ácido nucleico durante la síntesis pero antes de que sea anclado, *p. ej.*, por medio de hibridación, a la región de anclaje a la marca del armazón. Alternativamente, durante la síntesis de un parche de ácido nucleico, se puede incluir un nucleótido que contiene un grupo aceptor del monómero marcador, y se puede añadir el monómero marcador al parche de ácido nucleico después de su síntesis, ya sea antes o después de que sea anclado a la región de anclaje a la marca del armazón. Alternativamente, el monómero marcador puede ser anclado indirectamente al parche, por ejemplo mediante hibridación del parche a un "ala" que sirve como base para el anclaje del monómero marcador al nanoinformador.

20 De este modo, cuando un parche es un ácido nucleico, éste puede oscilar de 20 nucleótidos a más de 5 kb de longitud, dependiendo del método de ensamblaje del nanoinformador.

25 Por ejemplo, cuando un parche ha incorporado covalentemente uno o más monómeros marcadores que emiten señales que son parte del código del nanoinformador en el contexto del nanoinformador marcado, el parche tiene preferiblemente de alrededor de 100 a alrededor de 10.000 bases, más preferiblemente de 200 a alrededor de 2000 bases, y aún más preferiblemente de 700 a alrededor de 1200 nucleótidos de longitud, y es referido generalmente en la presente memoria como "segmento", siendo un segmento "oscuro" el parche antes de la incorporación del monómero marcador (pero, en una realización preferida, contiene sitios aceptores del monómero marcador, tales como aminoalilnucleótidos), y siendo el segmento "coloreado" uno que contiene el monómero marcador o los monómeros marcadores deseados. La  $T_m$  de un segmento cuando hibrida con esta región de anclaje a la marca es preferiblemente  $>80^\circ\text{C}$ , más preferiblemente  $>90^\circ\text{C}$ , en  $\text{Na}^+$  825 mM (5X SSC).

30 Cuando el parche sirve solamente como molde para el anclaje del ala al nanoinformador, este tiene preferiblemente un tamaño más pequeño, por ejemplo alrededor de 25-250 nucleótidos de longitud, y tiene muy preferiblemente alrededor de 50-100 nucleótidos de longitud. Tales parches son referidos en la presente memoria como "parches de oligonucleótido". Como se detalla en la Sección de más abajo, un oligonucleótido tiene preferiblemente una secuencia parcialmente complementaria a un armazón, de manera que cuando éste es recocado al armazón, se genera un saliente que es complementario a toda o a una porción de un ala.

35 Los términos "segmento" y "parche de oligonucleótido" se utilizan en la presente memoria simplemente por conveniencia de descripción, sin embargo, no hay tamaño de corte para distinguir un "segmento" de un "parche de oligonucleótido". El propósito de ambos tipos de estructuras es maximizar el marcaje -- y de este modo la intensidad de la señal -- del nanoinformador, permitiendo de ese modo la detección de una única molécula diana por un nanoinformador.

40 En ciertos aspectos, la presente invención emplea una molécula sintética, cuya configuración se ilustra mediante la referencia a la **Figura 7A**, que comprende una hebra de ácido nucleico (**armazón**) y una pluralidad de pares de parches hibridados a dicha hebra, donde cada par de parches comprende un parche "A" y un parche "B", donde, para cada par de parches, (a) cada parche "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región (1P) y una segunda región (2P), estando dicha primera región (i) en el extremo alfa de dicho parche "A", y (ii) hibridada a una primera porción de dicha hebra, estando dicha segunda región (ii) en el extremo beta de dicho parche "A"; (b) cada parche "B" es un oligonucleótido que comprende una tercera región (3P) y una cuarta región (4P), estando dicha tercera región (i) en el extremo alfa de dicho parche "B", y (ii) hibridada a dicha segunda región de dicho parche "A", estando dicha cuarta región (i) en el extremo beta de dicho parche "B" y (ii) hibridada a una segunda porción de dicha hebra, estando dicha segunda porción de dicha hebra en el extremo beta de dicha primera porción de dicha hebra, donde dicha segunda región o dicha tercera región comprende adicionalmente en su extremo beta o extremo alfa, respectivamente, una región hibridable que no está hibridada a dichos parche "B" o parche "A", respectivamente.

50 En la molécula sintética de la **Figura 7A**, la segunda región puede comprender adicionalmente en su extremo beta una región hibridable que no está hibridada a dicho parche "B", como se representa en la **Figura 7B**, o la tercera región comprende adicionalmente en su extremo alfa una región hibridable que no está hibridada a dicho parche "A", como se representa en la **Figura 7C**.

La presente invención emplea adicionalmente una molécula sintética, cuya configuración se ilustra mediante la referencia a la **Figura 7D**, que comprende una hebra de un ácido nucleico (**armazón**) y una pluralidad de pares de parches hibridados a dicha hebra, donde cada par de parches comprende un parche "A" y un parche "B", donde, para cada par de parches, (a) cada parche "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región (**1P**) y una segunda región (**2P**), estando dicha primera región (i) en el extremo alfa de dicho parche "A", y (ii) hibridada a una primera porción de dicha hebra, estando dicha segunda región (ii) en el extremo beta de dicho parche "A"; (b) cada parche "B" es un oligonucleótido que comprende una tercera región (**3P**) y una cuarta región (**4P**), estando dicha tercera región (i) en el extremo alfa de dicho parche "B", y (ii) hibridada a dicha segunda región de dicho parche "A", estando dicha cuarta región (i) en el extremo beta de dicho parche "B" y (ii) hibridada a una segunda porción de dicha hebra, estando dicha segunda porción de dicha hebra hacia el principio de dicha primera porción de dicha hebra, donde dicha segunda región comprende adicionalmente en su extremo beta una primera región hibridable que no está hibridada a dicho parche "B", y donde dicha tercera región comprende adicionalmente en su extremo alfa una segunda región hibridable que no está hibridada a dicho parche "A".

En la molécula sintética de la **Figura 7B**, cada par de parches puede estar anclado a un par de alas, como se representa en la **Figura 7F**, donde cada par de alas comprende un ala "A" y una ala "B", donde, para cada par de alas, (a) cada ala "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región del ala (**1F**) y una segunda región del ala (**2F**); estando dicha primera región del ala en el extremo alfa de dicho ala "A"; estando dicha segunda región del ala (i) en el extremo beta de dicha ala "A" y (ii) comprendiendo en su extremo beta una región hibridable que no está hibridada a dicho parche "A", parche "B" o ala "B"; y (b) cada ala "B" es un oligonucleótido que comprende una tercera región del ala (**3F**), una cuarta región del ala (**4F**), y una quinta región del ala (**5F**); estando dicha tercera región del ala (i) en el extremo alfa de dicha ala "B" y (ii) comprendiendo en su extremo alfa una región hibridable que no está hibridada a dicho parche "A", parche "B" o ala "A"; estando dicha cuarta región del ala (i) entre las tercera región del ala y la quinta región del ala y (ii) hibridada a dicha primera región del ala de dicha ala "A"; estando dicha quinta región del ala (i) en el extremo beta de dicha ala "B", y (ii) hibridada a dicha región hibridable de dicha segunda región de dicho parche "A".

En la molécula sintética de la **Figura 7C**, cada par de parches puede estar anclado a un par de alas, como se representa en la **Figura 7E**, donde cada par de alas comprende un ala "A" y un ala "B", donde, para cada par de alas, (a) cada ala "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región del ala (**1F**), una segunda región del ala (**2F**), y una tercera región del ala (**3F**); estando dicha región del ala "A" (i) en el extremo alfa de dicha ala "A" y (ii) hibridada a dicha región hibridable de dicha tercera región de dicha ala "B"; estando dicha segunda región del ala entre la primera región del ala y la tercera región del ala; estando dicha tercera región del ala (i) en el extremo beta de dicha ala "A" y (ii) comprendiendo en su extremo beta una región hibridable que no está hibridada a dicho parche "A", parche "B" o ala "B", y (b) cada ala "B" es un oligonucleótido que comprende una cuarta región del ala (**4F**) y una quinta región del ala (**5F**); estando dicha cuarta región del ala (i) en el extremo alfa de dicha ala "B" y (ii) comprendiendo en su extremo alfa una región hibridable que no está hibridada a dicho parche "A", parche "B" o ala "A"; estando dicha sexta región del ala (i) en el extremo beta de dicha ala "B", y (ii) hibridada a dicha segunda región del ala de dicha ala "A".

En la molécula sintética de las **Figuras 7D y 7E**, las alas divididas se pueden anclar a uno (*p. ej.*, **(1O)**), o más (*p. ej.*, **(2O)** y **(3O)**) oligonucleótidos, como se representa en la **Figura 7G**. De este modo, los uno o más oligonucleótidos pueden estar anclados a la totalidad o a una porción del ala "A" individualmente (*p. ej.*, **(1O)**), el ala "B" individualmente (*p. ej.*, **(3O)**), o abarcar toda o una porción de cada una del ala "A" y el ala "B" (*p. ej.*, **(2O)**). Tales oligonucleótidos están preferiblemente unidos covalentemente a uno o más monómeros marcadores.

Las regiones hibridables de dichas moléculas sintéticas se pueden hibridar a una pluralidad de oligonucleótidos, cada uno unido, preferiblemente unido covalentemente, a al menos un monómero marcador, más preferiblemente a al menos cinco monómeros marcadores. En ciertas realizaciones, todos los oligonucleótidos anclados a un solo par de parches comprenden los mismos monómeros marcadores, *p. ej.*, comprenden monómeros marcadores que emiten luz a las mismas longitudes de onda; en realizaciones específicas, todos los oligonucleótidos anclados a al menos dos, o al menos cuatro, pares de parches adyacentes comprenden preferiblemente los mismos monómeros marcadores. Uno o más de los oligonucleótidos pueden estar unidos a al menos una etiqueta de afinidad.

En ciertas realizaciones preferidas, los monómeros marcadores son fluoróforos o puntos cuánticos.

En la molécula sintética descrita más arriba, alfa puede hacer referencia a 5' o 3', y la correspondiente beta a 3' o 5', respectivamente.

La región de complementariedad de cada par de parches, o entre un parche dado y la correspondiente ala, tiene preferiblemente alrededor de 20 a 5.000 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la región de complementariedad tiene alrededor de 20 a 100 nucleótidos, o alrededor de 5 a 50 nucleótidos.

En las moléculas sintéticas descritas más arriba, cada ala tiene preferiblemente alrededor de 50 a 5.000 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, cada ala tiene alrededor de 50 a 150 nucleótidos.

Las moléculas sintéticas descritas más arriba pueden comprender adicionalmente una región específica de la diana que se une a una molécula diana. La región específica de la diana se puede anclar al extremo beta o alfa de dicha hebra.

5 En ciertas realizaciones, la molécula sintética descrita más arriba comprende al menos diez pares de parches, o al menos cincuenta pares de parches.

En las moléculas sintéticas descritas más arriba, la hebra o armazón, puede ser un vector linealizado, tal como M13 linealizado.

10 La molécula sintética descrita más arriba puede comprender adicionalmente (a) una primera región de anclaje a la marca a la cual están anclados (directamente o indirectamente) uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal; (b) una segunda región de anclaje a la marca, que es no solapante con la primera región de anclaje a la marca, a la cual están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal; (c) una tercera región de anclaje a la marca, que no es solapante con la primera y la segunda regiones de anclaje a la marca, a la cual están anclados uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; donde cada región de anclaje comprende una pluralidad de pares de parches; donde la primera y segunda señales son distinguibles espectralmente; donde la segunda y tercera señales son distinguibles espectralmente; donde la primera y segunda señales no se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dicha primera, segunda y tercera señales; donde la segunda y tercera señales no se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dichas primera, segunda y tercera señales; donde la primera y tercera señales se pueden resolver espacialmente en las condiciones que se pueden utilizar para detectar dichas primera, segunda y tercera señales; y donde las identidades de la primera, segunda y tercera señales y las localizaciones de la primera y tercera señales relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica la molécula diana.

#### 5.4 MONÓMEROS MARCADORES

25 Los nanoinformadores de la presente invención se pueden marcar con cualquiera de una variedad de monómeros marcadores, tales como un radioisótopo, un fluorocromo, un colorante, una enzima, una nanopartícula, un marcador quimioluminiscente, biotina, u otro monómero conocido en la técnica que se pueda detectar directamente (p. ej., mediante emisión de luz) o indirectamente (p. ej., mediante unión de un anticuerpo marcado fluorescentemente). Al menos la primera y segunda regiones de anclaje a la marca del nanoinformador están marcadas con uno o más monómeros marcadores, y las señales emitidas por los monómeros marcadores anclados a las regiones de anclaje a la marca de un nanoinformador constituyen un código que identifica la diana a la cual se une la región específica de la diana del nanoinformador. En ciertas realizaciones, la carencia de una señal dada de la región de anclaje a la marca (esto es, un punto "oscuro") también puede constituir parte del código del nanoinformador. Un ejemplo de un punto oscuro se representa en la posición 12 del nanoinformador de la Figura 1A.

35 Los radioisótopos son un ejemplo de monómeros marcadores que pueden ser utilizados por la invención. Se pueden utilizar varios radioisótopos como monómeros marcadores para marcar nucleótidos o proteínas, incluyendo, por ejemplo,  $P^{32}$ ,  $P^{33}$ ,  $S^{35}$ ,  $H^3$ , e  $I^{125}$ . Estos radioisótopos tienen diferentes vidas medias, tipos de decadencia, y niveles de energía que pueden ser ajustados para satisfacer las necesidades de un experimento concreto. Por ejemplo,  $H^3$  es un emisor de baja energía que da como resultado bajos niveles de fondo, sin embargo esta baja energía da como resultado períodos de tiempo prolongados para la autorradiografía. Los ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y aminoácidos marcados radiactivamente se encuentran disponibles en el mercado. Se encuentran disponibles nucleótidos que están marcados radiactivamente en el primer grupo fosfato  $\alpha$ , o el tercer grupo fosfato, o  $\gamma$ . Por ejemplo, tanto  $[\alpha\text{-}^{32}P]$  dATP como  $[\gamma\text{-}^{32}P]$  dATP se encuentran disponibles en el mercado. Además, también se encuentran disponibles en el mercado diferentes actividades específicas para nucleótidos marcados radiactivamente y se pueden adaptar a diferentes experimentos.

45 Otro ejemplo de monómeros marcadores que pueden ser utilizados por la invención son los fluoróforos. Se pueden utilizar varios fluoróforos como monómeros marcadores para marcar nucleótidos incluyendo, por ejemplo, fluoresceína, tetrametilrodamina, y Rojo Texas. Se conocen varios fluoróforos diferentes, y se continúan produciendo más, que abarcan el espectro completo. Asimismo, se han producido diferentes formulaciones del mismo fluoróforo para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, se puede utilizar fluoresceína, en su forma isotiocianato (FITC), en forma de isómeros mezclados o isómeros individuales de éster succinimidílico de carboxifluoresceína (FAM), o como formas de diclorotriazina isomérica de fluoresceína (DTAF). Estos monómeros son químicamente distintos, pero todos emiten luz con un pico entre 515-520 nm, generando de ese modo una señal similar. Además de las modificaciones químicas de la fluoresceína, se han sintetizado fluoróforos completamente diferentes que tienen los mismos picos de emisión o muy similares a los de la fluoresceína. Por ejemplo, el colorante Verde Oregón tiene espectros de excitación y emisión virtualmente superponibles en comparación con la fluoresceína. Otros fluoróforos tales como Verde Rhodol y Verde Rodamina tienen picos de emisión solo ligeramente desplazados y por lo tanto también sirven funcionalmente como sustitutos de la fluoresceína. Además, se han desarrollado diferentes formulaciones o colorantes relacionados en torno a otros fluoróforos que emiten luz en otras partes del espectro.



También se encuentran disponibles monómeros marcadores no radiactivos y no fluorescentes. Por ejemplo, se puede anclar biotina directamente a los nucleótidos y detectarla mediante la unión específica y de alta afinidad a avidina o estreptavidina que ha sido acoplada químicamente a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica (tal como fosfatasa, luciferasa, o peroxidasa). Los nucleótidos marcados con digoxigenina también pueden ser utilizados de manera similar para la detección no isotópica de ácidos nucleicos. Los nucleótidos biotinilados y marcados con digoxigenina se encuentran disponibles en el mercado.

También se pueden utilizar partículas muy pequeñas, denominadas nanopartículas, como monómeros marcadores para marcar ácidos nucleicos. Estas partículas oscilan de 1-1000 nm de tamaño e incluyen diversas estructuras químicas tales como partículas de oro y plata y puntos cuánticos.

Cuando se irradia con luz blanca que incide formando ángulo, las nanopartículas de plata y oro que oscilan de 40-120 nm dispersarán la luz monocromática con una alta intensidad. La longitud de onda de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula. Cuatro a cinco partículas diferentes en íntima proximidad dispersarán cada una luz monocromática que cuando se superponga dará un único color específico. Las partículas están siendo fabricadas por compañías tales como Genicon Sciences. Las partículas de plata y oro derivatizadas pueden ser ancladas a una amplia matriz de moléculas que incluyen, proteínas, anticuerpos, pequeñas moléculas, ligandos de receptores, y ácidos nucleicos. Por ejemplo, la superficie de la partícula puede ser químicamente derivatizada para permitir el anclaje a un nucleótido.

Otro tipo de nanopartícula que se puede utilizar como monómero marcador son los puntos cuánticos. Los puntos cuánticos son cristales fluorescentes de 1-5 nm de diámetro que son excitables por un amplio intervalo de longitudes de onda de luz. Estos cristales emiten luz, tal como luz monocromática, con una longitud de onda dependiente de su composición química y tamaño. Los puntos cuánticos tales como CdSe, ZnSe, InP, o InAs poseen propiedades ópticas únicas.

Se pueden crear muchas docenas de clases de partículas de acuerdo con el número de clases de tamaños de cristales de puntos cuánticos. Las clases de tamaños de los cristales se crean o bien 1) por medio de un estricto control de los parámetros de formación de los cristales para crear cada clase de partículas del tamaño deseado, o bien 2) por medio de la creación de lotes de cristales bajo parámetros para la formación controlada de cristales sin excesivo rigor, seguido de clasificación de acuerdo con el tamaño deseado y/o las longitudes de onda de emisión. El uso de puntos cuánticos para el marcaje de partículas, en el contexto de la presente invención, es nuevo, pero en la técnica de los semiconductores es antiguo. Dos ejemplos de referencias anteriores en las que los puntos cuánticos están embebidos en capas epitaxiales de silicio intrínsecas de dispositivos de emisión/detección de luz semiconductores son las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.293.050 y 5.354.707 de Chapple Sokol, et al.

En realizaciones específicas, una o más de las regiones de anclaje a la marca del nanoinformador están marcadas con uno o más colorantes emisores de luz, conteniendo cada región de anclaje a la marca, directamente o indirectamente, uno o más monómeros marcadores. La luz emitida por los colorantes puede ser luz visible o luz invisible, tal como luz ultravioleta o infrarroja. En realizaciones ilustrativas, el colorante es un colorante de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); un colorante de xanteno, tal como fluoresceína y rodamina; un colorante que tiene un grupo amino en la posición alfa o beta (tal como un colorante de naftilamina, 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftalenosulfonato y 2-p-touidinil-6-naftalensulfonato); un colorante que tiene 3-fenil-7-isocianatocumarina; una acridina, tal como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; un pireno, un benzoxadiazol y un estilbeno; un colorante que tiene 3-(ε-carboxipentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CYA); 6-carboxifluoresceína (FAM); 5 y 6-carboxirrodamina-110 (R110); 6-carboxirrodamina-6G (R6G); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); 6-carboxi-X-rodamina (ROX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); ALEXA Fluor<sup>®</sup>; Cy2; Rojo Texas y Rojo Rodamina; 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX); 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína (ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3.5; Cy5; Cy5.5; Cy7; yd Cy7.5; Alexa Fluor 350; Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; o Alexa Fluor 647.

Los monómeros marcadores se pueden incorporar a un nanoinformador en diferentes fases de su ensamblaje, o en un componente (*p. ej.*, un "ala" del nanoinformador antes de ensamblaje en el nanoinformador).

Un monómero marcador se puede anclar directamente a un nucleótido utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Los nucleótidos también se pueden modificar químicamente o derivatizar con el fin de anclarlos a un monómero marcador. Por ejemplo, se puede anclar un monómero fluorescente tal como una molécula de fluoresceína a dUTP (desoxiuridin-trifosfato) utilizando un grupo aminoalquilino de cuatro átomos. Cada monómero marcador se ancla a un nucleótido formando un complejo de monómero marcador:nucleótido.

Este complejo de monómero marcador:nucleótido se puede incorporar a los ácidos nucleicos (por ejemplo, un parche de ADN o un oligonucleótido de detección) de diferentes maneras. Por ejemplo, se puede incorporar un complejo de monómero marcador:nucleótido solamente en una localización dentro del ácido nucleico o en dos o más localizaciones dentro del ácido nucleico.

Se encuentran disponibles fluoróforos reactivos con amina y reactivos con tiol y se utilizan para el marcaje de nucleótidos y biomoléculas. Generalmente, los nucleótidos se marcan fluorescentemente durante la síntesis química, por ejemplo, la incorporación de aminas o tioles durante la síntesis de nucleótidos permite la adición de fluoróforos. Los nucleótidos marcados fluorescentemente se encuentran disponibles en el mercado. Por ejemplo, se encuentran disponibles uridin y desoxiuridin trifosfatos que están conjugados a diez fluoróforos diferentes que cubren el espectro.

Se puede anclar un nucleótido a un monómero marcador primero y después se puede incorporar a un ácido nucleico. Alternativamente, se puede marcar un ácido nucleico existente anclando un monómero marcador a un nucleótido dentro del ácido nucleico. Por ejemplo se pueden incorporar nucleótidos UTP modificados con aminoalilo ("AA") al ARN producto durante la transcripción. En diferentes realizaciones, 20% o más de los nucleótidos UTP de una reacción de transcripción para generar parches de ARN son modificados con AA. En algunas realizaciones, alrededor de 20% a 100%, de 20% a 80%, de 30 a 80%, de 40 a 60% o de 50% a 75% de los UTP de una reacción de transcripción están modificados con AA, en una realización preferida, aproximadamente 50% de los UTP de una reacción de transcripción están modificados con AA.

Además, por ejemplo, se pueden incorporar diferentes tipos de complejos de monómero marcador:nucleótido a un único ácido nucleico, donde un componente del código del nanoinformador comprende más de un tipo de señal.

También se pueden utilizar como monómeros marcadores colorantes fluorescentes que se pueden unir directamente a los nucleótidos. Por ejemplo, FAM, JOE, TAMRA, y ROX son colorantes fluorescentes reactivos con aminas que han sido anclados a nucleótidos y se utilizan en la secuenciación automática de ADN. Estos nucleótidos marcados fluorescentemente, por ejemplo, ROX-ddATP, ROX-ddCTP, ROX-ddGTP y ROX-ddUTP, se encuentran disponibles en el mercado.

Otros tipos de monómeros marcadores que se pueden utilizar para marcar un nanoinformador son los puntos cuánticos. Debido a su muy pequeño tamaño los puntos cuánticos se pueden acoplar a oligonucleótidos directamente sin afectar a la solubilidad o al uso del oligonucleótido. En una realización preferida, solamente se acopla una molécula de oligonucleótido a cada nanopartícula. Para sintetizar un complejo de oligonucleótido-nanopartícula en una proporción 1:1 por medio de la química por lotes convencional, tanto el oligonucleótido como la nanopartícula requieren un único grupo reactivo de diferentes clases que pueden reaccionar entre sí. Por ejemplo, si un oligonucleótido tiene un grupo amino y una nanopartícula tiene un grupo aldehído, estos grupos pueden reaccionar para formar una base de Schiff. Se puede derivatizar un oligonucleótido para anclar un único grupo amino u otro grupo funcional utilizando la química bien conocida en la técnica. Sin embargo, cuando una nanopartícula es derivatizada, ésta se recubre con un reactivo químico que da como resultado el recubrimiento de la superficie completa de la nanopartícula con varios grupos funcionales.

La invención proporciona un método de acoplamiento de un oligonucleótido a una nanopartícula mediante acoplamiento químico del oligonucleótido sobre una superficie sólida tal como el soporte de vidrio utilizado para la síntesis de oligonucleótidos.

Por ejemplo, se pueden utilizar resinas disponibles en el mercado para la síntesis de oligonucleótidos tales como el vidrio de poro controlado con alquilamino de cadena larga (Icaa CPG).

Alternativamente, se puede utilizar una superficie plana tal como un portaobjetos de microscopio derivatizado. La densidad en superficie de las cadenas de oligonucleótido nacientes debe ser inferior al diámetro de la nanopartícula. Esto se puede lograr o bien eligiendo un soporte de vidrio con una baja densidad en superficie de los grupos reactivos, o bien utilizando reactivo diluido para la primera etapa de la síntesis del oligonucleótido de manera que la superficie no se sature. Otro punto a considerar cuando se utilizan matrices de vidrio convencionales para la síntesis de oligonucleótidos es el uso de un diámetro de poro mayor que el diámetro de la nanopartícula para asegurar el flujo de los reactivos. Por ejemplo, se puede sintetizar un oligonucleótido sobre una base diluida con relación al soporte sólido, por ejemplo un décimo de una síntesis normal, para asegurar un buen espaciamiento de los oligonucleótidos sobre el soporte de vidrio. Una vez que el oligonucleótido es sintetizado con un grupo reactivo funcional, por ejemplo, un grupo amino, las nanopartículas derivatizadas se hacen pasar sobre el soporte de vidrio para que reaccionen con los oligonucleótidos. Se puede seleccionar un tamaño de poro suficientemente grande del soporte de vidrio para evitar la obstrucción con las nanopartículas. Por ejemplo, se puede utilizar un tamaño de poro de alrededor de 200 nm. Una vez completada la reacción, los grupos que no han reaccionado sobre la nanopartícula se pueden bloquear y los complejos se pueden desacoplar del soporte de vidrio.

## 5.5 EL CÓDIGO DEL NANOINFORMADOR

### 5.5.1 NANOINFORMADORES DUALES

Un nanoinformador cuyos componentes existen en dos entidades moleculares es referido como nanoinformador dual (o par de sondas). En un nanoinformador dual de acuerdo con la presente invención, cada componente contiene una secuencia específica de la diana, que mejora la especificidad y la cinética de unión del nanoinformador a su diana. Las dos secuencias específicas de la diana diferentes se diseñan o se seleccionan de manera que cada una reconoce una porción diferente de una molécula diana.

Las Figuras 1A-1C ilustran realizaciones de la invención que implican nanoinformadores duales. En las Figuras 1A y 1B, cada uno de los dos componentes del nanoinformador se marca, de manera que el código espectral del nanoinformador se forma solamente cuando los dos componentes del nanoinformador se juntan después de la unión del nanoinformador dual a su molécula diana. No obstante, en un nanoinformador dual, no es necesario que ambos componentes estén marcados. Por ejemplo, como se representa en la Figura 1C, un componente de un nanoinformador dual se marca con el código del nanoinformador; y el otro componente se ancla a una etiqueta de afinidad (flecha) que es útil para inmovilizar el nanoinformador para su estiramiento y visualización.

### 5.5.2 REGISTROS

El término "registro" hace referencia a un conjunto de regiones de anclaje a la marca alternantes (una si y una no). Los registros son útiles cuando es deseable marcar regiones de anclaje a la marca adyacentes sin una región espaciadora, y cuando la señal que emana de las regiones de anclaje a la marca adyacentes no se puede resolver espacialmente utilizando el método de detección deseado. De este modo, las señales detectadas con el uso de un registro son aquellas formadas por las regiones de anclaje a la marca alternantes en lugar de adyacentes. Las señales detectadas a partir de una pluralidad de registros (*p. ej.*, que juntos son todas regiones de anclaje a la marca) se pueden combinar para formar un código del nanorregistro. Generalmente cuando se utilizan registros, las regiones de anclaje a la marca adyacentes se marcan con monómeros marcadores distinguibles espectralmente.

Los ejemplos de los registros se representan en las Figuras 3 y 5. Por ejemplo, en la Figura 3A-3B, existen 8 regiones de anclaje a la marca 1-8. Las regiones de anclaje a la marca alternantes 1, 3, 5 y 7 forman un registro, y las regiones de anclaje a la marca 2, 4, 6 y 8 forman otro registro. En la Figura 3A, solamente uno de los registros (1, 3, 5 y 7) está marcado; en la Figura 3B, ambos registros están marcados.

### 5.6 ETIQUETAS DE AFINIDAD

Se pueden utilizar una variedad de etiquetas de afinidad conocidas en la técnica para purificar y/o inmovilizar los nanoinformadores.

Cuando se utiliza una etiqueta de afinidad para inmovilizar un nanoinformador para la detección y la formación de imágenes, ésta puede ser referida en la presente memoria como un "ancla". En una realización preferida, se adjunta un ancla de biotina al nanoinformador, permitiendo la inmovilización del nanoinformador sobre un portaobjetos recubierto con estreptavidina.

Un etiqueta de afinidad se puede utilizar para el anclaje a cuentas u otras matrices para una variedad de aplicaciones útiles incluyendo pero no limitadas a la purificación.

Se proporcionan más abajo ejemplos no limitantes de etiquetas de afinidad adecuadas. Se debe entender que la mayor parte de las etiquetas de afinidad podrían servir para dobles propósitos: como anclas para la inmovilización de los nanoinformadores y como etiquetas para la purificación de los nanoinformadores (ya sea totalmente o solo parcialmente ensamblados) o sus componentes.

En ciertas realizaciones, la etiqueta de afinidad es un monómero de proteína. Los ejemplos de los monómeros de proteína incluyen, pero no están limitados a, las regiones constantes de inmunoglobulinas (véase Petty, 1996, Metal-chelate affinity chromatography, en Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience), glutation S-transferasa (GST; Smith, 1993, Methods Mol. Cell Bio. 4:220-229), la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (Guan et al., 1987, Gene 67:21-30), y diversos dominios de unión a celulosa (Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.496.934; 5.202.247; 5.137.819; Tomme et al., 1994, Protein Eng. 7:117-123), etc. Otras etiquetas de afinidad son reconocidas por patrones de unión específicos y de este modo facilitan el aislamiento y la inmovilización mediante unión por afinidad al compañero de unión, que puede estar inmovilizado sobre un soporte sólido. Por ejemplo, la etiqueta de afinidad puede ser un epítipo, y el compañero de unión un anticuerpo. Los ejemplos de tales epítipos incluyen, pero no están limitados a, el epítipo FLAG, el epítipo myc en los aminoácidos 408-439, el epítipo de la hemaglutinina del virus de la influenza (HA), o la digoxigenina ("DIG"). En otras realizaciones, la etiqueta de afinidad es una secuencia de proteína o aminoácidos que es reconocida por otra proteína o aminoácido, por ejemplo la avidina/estreptavidina y la biotina.

En ciertos aspectos de la invención, la etiqueta de afinidad es una secuencia de nucleótidos. Se pueden utilizar una gran variedad de secuencias de alrededor de 8 a alrededor de 30 bases, más preferiblemente de alrededor de 10 a alrededor de 20 bases, para la purificación e inmovilización de nanoinformadores, y la secuencia se puede repetir en tándem (*p. ej.*, de 1 a 10 repeticiones en tándem). Preferiblemente tal secuencia no está ampliamente representada (esto es, presente en menos de 5% de los genes, más preferiblemente, presente en menos de 3% de los genes, y, muy preferiblemente, presente en menos de 1% de los genes) en la muestra que está siendo analizada (por ejemplo, cuando el nanoinformador se utiliza para la detección de ARN celular humano, la secuencia preferiblemente no está ampliamente representada en el genoma humano); tiene poca o ninguna estructura secundaria o auto-complementariedad ya sea internamente o con copias de sí misma cuando se multimeriza (esto es, todas las estructuras secundarias de la etiqueta multimerizada tienen preferiblemente una Tm menor de 25°C a NaCl 1 M); no tiene una identidad significativa o complementariedad con las secuencias del armazón o segmento

(esto es, la  $T_m$  de las secuencias complementarias es preferiblemente menor de 25°C a NaCl 0,2 M); y tiene una  $T_m$  alrededor de 35-65°C, más preferiblemente alrededor de 40-50°C, en  $\text{Na}^+$  50 mM.

5 En ciertas realizaciones, se utilizan diferentes secuencias como etiquetas de purificación e inmovilización. En este caso, por ejemplo, la etiqueta de purificación puede ser como se ha descrito más arriba, pero la etiqueta de inmovilización puede estar en el intervalo de 10 a 100 bases, con una  $T_m$  de hasta 95°C en  $\text{Na}^+$  50 mM. Una realización alternativa tendría la etiqueta de purificación anidada dentro de la etiqueta de inmovilización (*p. ej.*, la etiqueta de afinidad comprendería una secuencia de 25 bases de las cuales 15 bases se utilizan como etiqueta de purificación y las 25 bases completas se utilizan como etiqueta de inmovilización).

10 En ciertos casos, la etiqueta de afinidad se puede utilizar para el marcaje de un nanoinformador además de para purificar o inmovilizar el nanoinformador.

Como apreciarán los expertos en la técnica, se pueden utilizar muchos métodos para obtener la región codificante de las etiquetas de afinidad, incluyendo pero no limitados a, clonación de ADN, amplificación de ADN, y métodos sintéticos. Algunas de las etiquetas de afinidad y reactivos para su detección y aislamiento se encuentran disponibles en el mercado.

## 15 5.7 SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE LA DIANA

El término "secuencia específica de la diana" hace referencia a una entidad molecular que es capaz de unirse a una molécula diana. En el contexto de un nanoinformador, la secuencia específica de la diana se ancla al armazón del nanoinformador.

20 La secuencia específica de la diana es generalmente una secuencia de aminoácidos (esto es, una secuencia de polipéptidos o péptidos) o una secuencia de ácido nucleico.

En realizaciones específicas, cuando la secuencia específica de la diana es una secuencia de aminoácidos, la secuencia específica de la diana es un fragmento de un anticuerpo, tal como un fragmento Fab' de un anticuerpo, un anticuerpo Fv de cadena sencilla.

25 La secuencia específica de la diana es preferiblemente una secuencia de ácido nucleico, y está muy preferiblemente en un oligonucleótido que está anclado covalentemente (*p. ej.*, mediante ligación) o anclado no covalentemente (*p. ej.*, mediante hibridación) al armazón del nanoinformador. Una secuencia de ácido nucleico específica de la diana tiene preferiblemente al menos 15 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente tiene al menos 20 nucleótidos de longitud. En realizaciones específicas, la secuencia específica de la diana tiene aproximadamente de 10 a 500, de 20 a 400, de 30 a 300, de 40 a 200, o de 50 a 100 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la secuencia específica de la diana tiene aproximadamente de 30 a 70, de 40 a 80, de 50 a 90, o de 60 a 100, de 30 a 120, de 40 a 140, o de 50 a 150 nucleótidos de longitud.

30 Una secuencia de nucleótidos específica de la diana tiene preferiblemente una  $T_m$  de alrededor de 65-90°C para cada sonda en  $\text{Na}^+$  825 mM (5X SSC), muy preferiblemente alrededor de 78-83°C.

35 En ciertas realizaciones preferidas, la secuencia específica de la diana de cada sonda de un nanoinformador dual tiene alrededor de 35 a 100 nucleótidos (para una secuencia diana total de alrededor de 70 a 200 nucleótidos, cubierta por 2 sondas), muy preferiblemente alrededor de 40 a 50 nucleótidos para cada sonda (para un total de alrededor de 80 a 100 nucleótidos).

## 5.8 MOLÉCULAS DIANA

40 El término "molécula diana" es la molécula detectada o medida mediante la unión de un nanoinformador marcado cuya secuencia o secuencias específicas de la diana se reconocen (son parejas de unión específicas para esta). Preferiblemente, una molécula diana puede ser, pero no está limitada a, cualquiera de las siguientes: ADN, ADNc, ARN, ARNm, un péptido, un polipéptido/proteína (*p. ej.*, una proteína bacteriana o viral o un anticuerpo), un lípido, un carbohidrato, una glicoproteína, un glicolípido, una pequeña molécula, un monómero orgánico, o un fármaco. Generalmente, una molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc.

45 Una molécula diana puede ser parte de una muestra biomolecular que contiene otros componentes o puede ser el único o principal componente de la muestra. Una molécula diana puede ser un componente de una célula o tejido completo, de un extracto celular o tisular, un producto lisado fraccionado del mismo o una molécula esencialmente purificada. La molécula diana puede estar anclada en solución o en fase sólida, incluyendo, por ejemplo, a una superficie sólida tal como un chip, una micromatriz o una cuenta. Asimismo, la molécula diana puede tener una estructura o secuencia conocida o desconocida.

50 En ciertas realizaciones específicas, esa molécula diana no es un cromosoma. En otras realizaciones específicas, la molécula diana no tiene un tamaño mayor de 1.000 kb (o 1 mb), un tamaño no mayor de 500 kb, un tamaño no mayor de 250 kb, un tamaño no mayor de 175 kb, un tamaño no mayor de 100 kb, un tamaño no mayor de 50 kb, un

tamaño no mayor de 20 kb, o un tamaño no mayor de 10 kb. En otras realizaciones específicas más, la molécula diana está aislada de su medio celular.

En realizaciones no limitantes, específicas, la molécula diana es uno de los siguientes anticuerpos o un antígeno reconocido por uno de los siguientes anticuerpos: un anticuerpo anti-receptor de estrógeno, un anticuerpo anti-receptor de progesterona, un anticuerpo anti-p53, un anticuerpo anti-Her-2/neu, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-catepsina D, un anticuerpo anti-Bcl-2, un anticuerpo anti-E-cadherina, un anticuerpo anti-CA125, un anticuerpo anti-CA15-3, un anticuerpo anti-CA19-9, un anticuerpo anti-c-erbB-2, un anticuerpo anti-P-glicoproteína, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-proteína de retinoblastoma, un anticuerpo anti-oncoproteína ras, un anticuerpo anti-Lewis X, un anticuerpo anti-Ki-67, un anticuerpo anti-PCNA, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5, un anticuerpo anti-CD7, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD9/p24, un anticuerpo anti-CD 10, un anticuerpo anti-CD11c, un anticuerpo anti-CD13, un anticuerpo anti-CD14, un anticuerpo anti-CD15, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD23, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD31, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD34, un anticuerpo anti-CD35, un anticuerpo anti-CD38, un anticuerpo anti-CD41, un anticuerpo anti-LCA/CD45, un anticuerpo anti-CD45RO, un anticuerpo anti-CD45RA, un anticuerpo anti-CD39, un anticuerpo anti-CD100, un anticuerpo anti-CD95/Fas, un anticuerpo anti-CD99, un anticuerpo anti-CD106, un anticuerpo anti-ubiquitina, un anticuerpo anti-CD71, un anticuerpo anti-c-myc, un anticuerpo anti-citoqueratinas, un anticuerpo anti-vimentinas, un anticuerpo anti-proteínas de HPV, un anticuerpo anti-cadenas ligeras kappa, un anticuerpo anti-cadena ligera lambda, un anticuerpo anti-melanosoma, un anticuerpo anti-antígeno específico de próstata, un anticuerpo anti-S-100, un anticuerpo anti-antígeno tau, un anticuerpo anti-fibrina, un anticuerpo anti-queratinas, una proteína receptora de anticuerpo para antígeno Tn, una linfoquina, una enzima, una hormona, un factor de crecimiento, o una proteína de unión a ácido nucleico, un ligando para un receptor de adherencia celular; un ligando para un receptor de transducción de la señal; una hormona; una molécula que se une a una molécula de la familia del dominio muerte; un antígeno; una partícula viral, una proteína de recubrimiento viral o uno de sus fragmentos, un polipéptido tóxico seleccionado del grupo que consiste en: (a) ricina, (b) exotoxina de *Pseudomonas* (PE); (c) briodina; (d) gelonina; (e)  $\alpha$ -sarcina; (f) aspergillina; (g) restrictocina; (h) angiogenina; (i) saporina; (j) abrina; (k) proteína antiviral de fitolaca (PAP); y (1) un fragmento funcional de cualquiera de (a)-(k); una citoquina, o una citoquina soluble seleccionada del grupo que consiste en eritropoyetina, interleuquinas, interferones, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformantes, factores de necrosis tumoral, factores estimuladores de colonias y factor de crecimiento epidérmico, antígenos del MHC de Clase I, antígenos del MHC de Clase II, receptores de la superficie celular internalizantes y/o receptores virales.

En realizaciones específicas, no limitantes, la molécula diana es un antígeno tal como alfa fetoproteína, alfa-1 antitripsina,  $\alpha$ -2 macroglobulina, adiponectina, apolipoproteína-A-1, apolipoproteína-CIII, apolipoproteína-H, BDNF,  $\beta$ -2 microglobulina, proteína C reactiva, calcitonina, antígeno canceroso 19-9, antígeno canceroso 125, CEA, CD 40, ligando de CD 40, complemento 3, GK-MB, EGF, ENA-78, endotelina-1, ENRAGE, eotaxina, eritropoyetina, Factor VII, FABP, ferritina, FGF básico, fibrinógeno, G-CSF, GST, GM-CSF, hormona de crecimiento, haptoglobina, ICAM-1, IFN-gamma, IgA, IgE, IGF-1, IgM, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-13, IL-15, IL-16, insulina, leptina, lipoproteína (a), linfotactina, MCP-1, MDC, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MMP-2, MMP-3, MMP-9, mieloperoxidasa, mioglobina, PAI-1, PAP, PAPP-A, SGOT, SHBG, PSA (libre), RANTES, amiloide P del suero, factor de células pluripotenciales, TBG, trombotopoyetina, TIMP-1, factor tisular, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TNF RII, TSH, VCAM-1, VEGF, o vWF.

En algunas realizaciones, la molécula diana es una molécula relacionada con la autoinmunidad tal como ASCA,  $\beta$ -2 glicoproteína, Clq, Prot. B del centrómero, colágeno tipo 1, colágeno tipo 2, colágeno tipo 4, colágeno tipo 6, Cyto P450, ADN dh, histona, histona H1, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4, HSC-70, HSP-32, HSP-65, HSP-71, HSP-90 $\alpha$ , HSP-90 $\beta$ , insulina, JO-I, mitocondrial, mieloperoxidasa, células de islotes pancreáticos, PCNA, PM-I, PR3, P ribosomal, RNP-A, RNP-C5 RNP, Sel-70, Smith, SSA, SSB, T3, T4, tiroglobulina, tTG, (enfermedad celiaca), o microsomal tiroideo.

En algunas realizaciones, la molécula diana es un componente aislado de un agente infeccioso, tal como Toxina del Cólera, Toxina $\beta$  del Cólera, *Campylobacter jejuni*, citomegalovirus, toxina de *Difteria*, NA de Epstein -Barr, EA de Epstein-Barr, VCA de Epstein-Barr, *Helicobacter pylori*, núcleo de HBV, envoltura de HBV, superficie de HBV (Ad), superficie de HBV (Ay), núcleo de HCV, NS3 de HCV, NS4 de HCV, NS5 de HCV, hepatitis A, hepatitis D, orf 2 3KD de HEV, orf2 6 KD de HEV, HEV orf 3KD, p24 de HIV-1, gp41 de HIV-1, gp120 de HIV-1, HPV, HSV-1/2, gD de HSV-1, gD de HSV-2, HTLV- 1/2, influenza A, H3N2 de influenza A, influenza B, *Leishmania donovani*, enfermedad de Lyme, paperas, M. pneumonia, M. tuberculosis, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, virus de polio, RSV, Rubella, Rubeola, Estreptolisina O, Toxina del Tétanos, T. pallidum 15kD, p47 de T. pallidum, T. cruzi, Toxoplasma, Varicella zoster.

## 5.9 POBLACIONES DE NANOINFORMADORES

Se describen en la presente memoria poblaciones de nanoinformadores o de unidades marcadoras de nanoinformadores, por ejemplo genotecas de nanoinformadores o unidades marcadoras de nanoinformadores, que contienen al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 750, o al menos 1.000

nanoinformadores o unidades marcadoras de nanoinformadores únicos, respectivamente. Según se utiliza en la presente memoria, "único" cuando se utiliza en referencia a un nanoinformador o a unidades marcadoras de nanoinformadores en una población se quiere significar un nanoinformador o una unidad marcadora que tiene un código que lo distingue de otros nanoinformadores o unidades marcadoras en la misma población.

- 5 En particular los autores de la presente invención describen poblaciones de nanoinformadores con al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000 o al menos 50.000 nanoinformadores o unidades marcadoras de nanoinformadores únicos.

10 Los nanoinformadores de una población de nanoinformadores pueden ser nanoinformadores singulares, nanoinformadores duales, o una combinación de los mismos. Los nanoinformadores pueden estar marcados o no marcados.

15 El tamaño de una población de nanoinformadores y la naturaleza de la secuencia específica de la dianas de los nanoinformadores en ella dependerán del uso pretendido del nanoinformador. Se pueden elaborar poblaciones de nanoinformadores en las cuales las secuencias específicas de la diana corresponden a marcadores de un tipo celular dado, incluyendo un tipo de célula enferma. Se pueden generar poblaciones de nanoinformadores en las cuales las secuencias específicas de la diana representan al menos 0,1%, al menos 0,25%, al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 5%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, o al menos 70% de los diferentes tipos de transcritos de una célula. Opcionalmente, se generan poblaciones de nanoinformadores en las cuales las secuencias específicas de la diana representan al menos 0,1%, al menos 0,25%, al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, o al menos 70% de los diferentes genes de una célula. Opcionalmente, se generan poblaciones de nanoinformador en las cuales al menos algunas de las secuencias específicas de la diana representan transcritos raros de una célula o tejido. Tales poblaciones de nanoinformadores representan preferiblemente al menos 5 transcritos raros. En realizaciones específicas, tales poblaciones de nanoinformadores representan al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 transcritos raros.

La célula o tejido puede ser una célula o tejido de mamífero, y más preferiblemente es una célula o tejido humano.

Opcionalmente, la población de nanoinformadores es una población de nanoinformadores de diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, se puede generar una población de nanoinformadores de diagnóstico que sea útil para escrutar productos sanguíneos, en la que las secuencias específicas de la diana se unen a los ácidos nucleicos de virus contaminantes tales como el de la hepatitis B, el de la hepatitis C, y el virus de la inmunodeficiencia humana. Alternativamente, la población de nanoinformadores de diagnóstico puede contener secuencias específicas de la diana correspondientes a marcadores de enfermedades celulares, tales como antígenos tumorales. Las poblaciones de nanoinformadores de pronóstico incluyen generalmente marcadores específicos de la diana que representan diferentes fases de una enfermedad dada tal como cáncer. Seleccionando secuencias específicas de la diana apropiadas, se puede utilizar una población de nanoinformadores tanto para diagnosticar como para pronosticar enfermedades.

### 5.10 MUESTRAS BIOMOLECULARES

Los pares de sondas de la invención se pueden utilizar para detectar la molécula diana en cualquier muestra biomolecular. Como apreciarán los expertos en la técnica, la muestra puede comprender cualquier número de objetos, incluyendo, pero no limitados a: células (incluyendo tanto células primarias como líneas celulares cultivadas), productos lisados o extractos celulares (incluyendo pero no limitados a extractos de ARN; ARNm purificado), tejidos y extractos tisulares (incluyendo pero no limitados a extractos de ARN; ARNm purificado); fluidos corporales (incluyendo, pero no limitados a, sangre, orina, suero, linfa, bilis, fluido cerebroespinal, fluido intersticial, humero vítreo y acuoso, calostro, esputo, fluido amniótico, saliva, secreciones anales y vaginales, sudor y semen, un transudado, un producto exudado (p. ej., fluido obtenido de un absceso o cualquier otro lugar de infección o inflamación) o fluido obtenido de una articulación (p. ej., una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad tal como artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artritis séptica) o virtualmente de cualquier organismo, siendo particularmente preferidas las muestras de mamífero y las muestras de ser humano; muestras medioambientales (incluyendo, pero no limitadas a, muestras de aire, agua y suelo agrícolas); muestras de agentes de conflictos biológicos; muestras de investigación incluyendo fluidos extracelulares, sobrenadantes extracelulares de cultivos celulares, cuerpos de inclusión de bacterias, compartimentos celulares, periplasma celular, compartimentos mitocondriales, etc.

Las muestras biomoleculares pueden derivar indirectamente de especímenes biológicos. Por ejemplo, cuando la molécula diana de interés es un transcrito celular, p. ej., un ARN mensajero, la muestra biomolecular de la invención puede ser una muestra que contiene ADNc producido mediante transcripción inversa del ARN mensajero. En otro ejemplo, la muestra biomolecular de la invención se genera sometiendo un espécimen biológico a fraccionamiento, p. ej., fraccionamiento por tamaño o fraccionamiento de membrana.

Las muestras biomoleculares de la invención pueden ser o bien "nativas", esto es, no sometidas a manipulación o tratamiento, o bien "tratadas", que pueden incluir cualquier número de tratamientos, incluyendo la exposición a agentes candidato incluyendo fármacos, ingeniería genética (p. ej. la adición o delección de un gen), etc.

### 5.11 SEPARACIÓN DE MONÓMEROS MARCADORES

5 Además de detectar una señal global generada a partir de un nanoinformador marcado, la invención proporciona la determinación de la localización espacial de señales que emanan de los monómeros marcadores (esto es, manchas) en un nanoinformador, representando cada mancha la señal agregada de los monómeros marcadores anclados a una región de anclaje a la marca dada. Una mancha puede contener señales de la misma longitud de onda o de diferentes longitudes de onda. De este modo, la naturaleza de las manchas en un nanoinformador y su localización constituyen el código del nanoinformador.

10 Se puede utilizar cualquiera de una variedad de métodos utilizados para "estirar" el nanoinformador para separar las manchas individuales. Por ejemplo, se puede estirar un nanoinformador utilizando una técnica de estiramiento por flujo (Henegariu et al, 2001, Biotechniques 31:246-50), una técnica de menisco en retracción (Yokota et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25:1064-1070) o una técnica de electroestiramiento (Matsuura et al, 2001, Nuc. Acids Res. 29: E79).

15 El uso de las técnicas de estiramiento por flujo, menisco en retracción, o electroestiramiento permite la separación de las regiones de anclaje a la marca dentro de un nanoinformador de manera que se pueda determinar espacialmente cuando una señal concreta está situada en el nanoinformador. Por lo tanto, los nanoinformadores únicos que tienen la misma combinación de monómeros marcadores y la misma señal global se pueden diferenciar de otros basados en la localización de esos monómeros marcadores dentro del nanoinformador.

20 Esta capacidad para localizar la posición de una región de anclaje a la marca o mancha dentro de un nanoinformador permite utilizar la posición de la señal o las señales emitidas por los monómeros marcadores de cada región de anclaje a la marca como una característica distintiva cuando genera un conjunto de nanoinformadores únicos. Por consiguiente, se puede generar un conjunto complejo de nanoinformadores utilizando la misma combinación de monómeros marcadores de partida variando las posiciones de los monómeros marcadores dentro de un nanoinformador.

Antes de estirar un nanoinformador, es preferible inmovilizar el nanoinformador en una superficie sólida utilizando una etiqueta de afinidad, como se describe en la Sección 5.6 más arriba.

25 En ciertos aspectos de la invención, un extremo del nanoinformador es inmovilizado, por medio de una unión específica o no específica en una superficie sólida, el nanoinformador es estirado, y después el otro extremo del informador es inmovilizado, también por medio de una unión específica o no específica en una superficie sólida. Por consiguiente, el nanoinformador es "congelado" en su estado estirado, o extendido, para facilitar la resolución del código del nanoinformador detectando y/o formando imágenes de las señales emitidas por los monómeros marcadores anclados a un nanoinformador y sus localizaciones relativas entre sí. Estos aspectos de la invención se describen más abajo en la Sección 5.12.

### 5.12 INMOVILIZACIÓN DE LOS NANOINFORMADORES ESTIRADOS

30 Los autores de la presente invención describen en la presente memoria métodos y composiciones que facilitan la identificación de las estructuras primarias de una variedad de nanoinformadores. En particular los autores de la presente invención describen métodos para la inmovilización selectiva de nanoinformadores en un estado extendido. En la presente invención, se puede inmovilizar selectivamente un nanoinformador mientras se utiliza totalmente extendido bajo cualquier fuerza para su extensión. Además, los métodos facilitan la inmovilización selectiva de los nanoinformadores extendidos que están orientados con respecto al otro. En otras palabras, se pueden inmovilizar fácilmente una pluralidad de nanoinformadores en la misma orientación con respecto al otro.

35 En primer lugar los autores de la presente invención describen métodos para inmovilizar selectivamente un nanoinformador en un estado extendido. Para los métodos, generalmente, una primera porción del nanoinformador es inmovilizado mediante cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica. En efecto, la técnica para inmovilizar la primera porción del nanoinformador no es crítica. En ciertos métodos, la primera porción del nanoinformador puede ser inmovilizada selectivamente o no selectivamente. En ciertos métodos la primera porción es inmovilizada por medio de uno o más enlaces covalentes. En ciertos métodos, la primera porción es inmovilizada por uno o más enlaces no covalentes. En las siguientes secciones se describen primeras porciones inmovilizadas ilustrativas.

40 Con una primera porción inmovilizada, se puede extender el nanoinformador mediante cualquier técnica para extender un nanoinformador evidente para los expertos en la técnica. En ciertos métodos, la técnica para extender el nanoinformador no es crítica para los métodos de la invención. En ciertos métodos, el mecanismo para extender el nanoinformador es apropiada para la clase de nanoinformador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. En ciertos métodos, el nanoinformador es extendido mediante la aplicación de una fuerza capaz de extender el nanoinformador. La fuerza puede ser cualquier fuerza evidente para un para un experto en la técnica para extender

el nanoinformador. Las fuerzas ilustrativas incluyen la gravedad, la fuerza hidrodinámica, la fuerza electromagnética y sus combinaciones. Las técnicas específicas para extender el nanoinformador se describen en las secciones de más abajo.

5 El nanoinformador está en un estado extendido i es reconocido como extendido por un experto en la técnica. En ciertos métodos, el nanoinformador está en un estado extendido cuando está en el campo de una fuerza capaz de extender el nanoinformador. En ciertos métodos, el nanoinformador está en un estado extendido cuando su radio hidrodinámico medio es más del doble del radio hidrodinámico medio del nanoinformador en su estado nativo como reconocen los expertos en la técnica.

10 Los métodos comprenden generalmente la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción del nanoinformador mientras está en estado extendido. Esto puede dar como resultado un nanoinformador inmovilizado que está extendido entre la primera y la segunda porción. Sorprendentemente, puesto que el nanoinformador es inmovilizado selectivamente mientras está extendido, esa extensión se puede conservar en el nanoinformador inmovilizado. Generalmente, la primera porción y la segunda porción del nanoinformador no son la misma.

15 La inmovilización selectiva puede realizarse de acuerdo con cualquier técnica para la inmovilización selectiva de una porción de un nanoinformador evidente para los expertos en la técnica. La inmovilización selectiva se puede realizar, por ejemplo, por medio de la formación de uno o más enlaces covalentes o uno o más enlaces no covalentes, o ambos. Los ejemplos concretos de las técnicas de inmovilización selectivas se describen en las secciones de más abajo. En métodos concretos, se utilizan uno o más pares de unión para inmovilizar la segunda porción del nanoinformador.

20 La segunda porción puede ser inmovilizada sobre cualquier sustrato evidente para los expertos en la técnica. El sustrato puede ser cualquier sustrato que se considere que es útil para la inmovilización conocido por los expertos en la técnica. En algunos métodos, la segunda porción puede ser inmovilizada con otra molécula. Los sustratos útiles adicionales incluyen superficies, membranas, cuentas, materiales porosos, electrodos, matrices y otros sustratos evidentes para los expertos en la técnica.

25 En segundo lugar, los autores de la presente invención describen una composición que comprende un nanoinformador extendido, inmovilizado selectivamente. Las composiciones generalmente comprenden un sustrato y un nanoinformador extendido inmovilizado selectivamente sobre el sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato conocido por los expertos en la técnica. Los sustratos ilustrativos incluyen aquellos descritos en las secciones de más abajo. Al menos dos porciones del nanoinformador son inmovilizadas sobre el sustrato, y el nanoinformador está en estado extendido entre las dos porciones. En ciertas composiciones, al menos una porción del nanoinformador es inmovilizada selectivamente sobre el sustrato. En ciertas composiciones, dos o más porciones del nanoinformador se inmovilizan selectivamente sobre el sustrato. El nanoinformador puede ser extendido y/o inmovilizado mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica, incluyendo particularmente los métodos descritos en la presente memoria.

35 En tercer lugar, los autores de la presente invención describen métodos para inmovilizar selectivamente un nanoinformador en un estado orientado. El nanoinformador puede ser cualquier nanoinformador descrito más arriba. En algunos métodos, el nanoinformador puede ser flexible, o en ciertas realizaciones el nanoinformador puede ser rígido o semirrígido. Para estos métodos, generalmente, se inmoviliza una primera porción del nanoinformador como se ha descrito antes. Con una primera porción inmovilizada, el nanoinformador puede ser orientado mediante cualquier mecanismo para extender un nanoinformador evidente para los expertos en la técnica. En algunos métodos, el mecanismo para orientar el nanoinformador no es crítico. En algunos métodos, el mecanismo para orientar el nanoinformador es apropiado para la clase de nanoinformador de acuerdo con el criterio del experto en la técnica. En algunos métodos, el nanoinformador se orienta mediante la aplicación de una fuerza capaz de orientar el nanoinformador. La fuerza puede ser cualquier fuerza evidente para un experto en la técnica para orientar el nanoinformador. Las fuerzas ilustrativas incluyen gravedad, fuerza hidrodinámica, fuerza electromagnética y sus combinaciones. Las técnicas específicas para extender el nanoinformador se describen en las subsecciones de más abajo.

50 El nanoinformador está en estado orientado si fuera reconocido como orientado por un experto en la técnica. Por ejemplo, el nanoinformador está en estado orientado cuando está en un campo de fuerza capaz de orientar el nanoinformador. Alternativamente, el nanoinformador está en estado orientado cuando sus extremos se disponen en paralelo, como reconocen los expertos en la técnica, con un campo de fuerza capaz de orientar el nanoinformador. Adicionalmente, una pluralidad de nanoinformadores está en estado orientado cuando los extremos de los nanoinformadores se disponen en paralelo, como reconocen los expertos en la técnica.

55 Los métodos comprenden generalmente la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción del nanoinformador mientras está en un estado orientado. Esto puede dar como resultado un nanoinformador inmovilizado que está orientado entre la primera y la segunda porciones. Sorprendentemente, puesto que el nanoinformador está inmovilizado selectivamente mientras está extendido, se puede conservar esa orientación en el nanoinformador inmovilizado. La inmovilización selectiva se puede realizar de acuerdo con los métodos descritos más arriba.



Asimismo se describe en la presente memoria una composición que comprende un nanoinformador orientado, inmovilizado selectivamente. Las composiciones comprenden generalmente un sustrato y un nanoinformador orientado selectivamente, inmovilizado sobre el sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato conocido por los expertos en la técnica. Los sustratos ilustrativos incluyen aquellos descritos en las secciones de más abajo. Al menos dos porciones del nanoinformador son inmovilizadas sobre el sustrato, y el nanoinformador está en un estado orientado entre las dos porciones. En ciertas composiciones, al menos, una porción del nanoinformador está inmovilizada selectivamente sobre el sustrato. En ciertas composiciones, ambas porciones del nanoinformador son inmovilizadas selectivamente sobre el sustrato. El nanoinformador puede estar orientado y/o inmovilizado mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica, incluyendo concretamente los métodos ilustrados en la presente memoria.

Los métodos y composiciones se pueden utilizar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar el nanoinformador extendido y/u orientado inmovilizado como una marca para un sustrato sobre el cual está inmovilizado el nanoinformador. La secuencia primaria del nanoinformador extendido y/u orientado inmovilizado puede ser identificada mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica. Ventajosamente, la inmovilización del nanoinformador extendido y/u orientado puede facilitar tales técnicas. Opcionalmente, el nanoinformador extendido y/u orientado inmovilizado se puede utilizar para guiar la fabricación de nanotrayectorias, por ejemplo para crear nanocables o nanocircuitos. Los usos adicionales para los nanoinformadores extendidos y/u orientados inmovilizados se describen en las secciones de más abajo.

Todos los términos utilizados en la presente memoria tienen sus significados habituales para los expertos en la técnica a menos que se indique de otro modo. Los siguientes términos tendrán los siguientes significados.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "par de unión" hace referencia a una primera y una segunda moléculas o radicales que son capaces de unirse selectivamente entre sí, esto es, de unirse entre sí con una afinidad mayor que los otros componentes de una composición. La unión entre los miembros del par de unión puede ser covalente o no covalente. En ciertas realizaciones, la unión es no covalente. Los pares de unión ilustrativos incluyen pares de unión inmunológicos (p. ej., cualquier compuesto hapténico o antigénico combinado con el correspondiente anticuerpo o porción de unión o fragmento del mismo, por ejemplo digoxigenina y anti-digoxigenina, fluoresceína y anti-fluoresceína, dinitrofenol y anti-dinitrofenol, bromodesoxiuridina y anti-bromodesoxiuridina, inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina anti-ratón de cabra) y pares de unión no inmunológicos (p. ej., biotina-avidina, biotina-estreptavidina, hormona-proteína de unión a hormona, receptor-ligando del receptor (p. ej., receptor de acetilcolina-acetilcolina o un análogo del mismo), IgG-proteína A, lectina-carbohidrato, enzima-cofactor de enzima, enzima-inhibidor de enzima, pares de polinucleótidos complementarios capaces de formar dúplex de ácidos nucleicos, y similares). Por ejemplo, los miembros de unión inmunorreactivos pueden incluir antígenos, haptenos, aptámeros, anticuerpos (primarios o secundarios), y complejos de los mismos, incluyendo aquellos formados por medio de métodos de ADN recombinante o síntesis peptídica. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína recombinante o una o varias mezclas o fragmentos de los mismos así como una mezcla de un anticuerpo y otros miembros de unión. Otros pares de unión comunes incluyen, pero no están limitados a, biotina y avidina (o sus derivados), biotina y estreptavidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias (incluyendo sondas y secuencias de ácidos nucleicos de captura), secuencias peptídicas complementarias incluyendo aquellas formadas mediante métodos recombinantes, moléculas efectoras y receptoras, hormonas y proteínas de unión a hormonas, cofactores de enzimas y enzimas, inhibidores de enzimas y enzimas, etcétera.

"Unión selectiva" hace referencia a cualquier unión preferente de un par de moléculas o radicales entre sí con respecto a otras moléculas o radicales en una composición que sería reconocida por un experto en la técnica. Opcionalmente, un par de moléculas o radicales se une selectivamente cuando se unen preferentemente entre sí en comparación con otras moléculas o radicales. La unión selectiva puede incluir afinidad o avidez, o ambas, de una molécula o un radical por otra molécula o radical. Opcionalmente, la unión selectiva requiere una constante de disociación ( $K_D$ ) de menos de alrededor de  $1 \times 10^{-5}$  M o menos de alrededor de  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M, o  $1 \times 10^{-10}$  M. Por el contrario, la unión no selectiva tiene opcionalmente una afinidad significativamente menor, por ejemplo, una  $K_D$  mayor de  $1 \times 10^{-3}$  M.

"Estado extendido" hace referencia a un nanoinformador en un estado que sería reconocido como extendido por un experto en la técnica. Un nanoinformador puede estar en un estado extendido cuando está extendido con respecto a su conformación nativa en solución. Un nanoinformador puede estar en estado extendido cuando está en un campo de fuerza capaz de extender el nanoinformador. Un estado extendido de un nanoinformador puede ser determinado cuantitativamente, de manera que, los expertos en la técnica reconocerán R como el vector de extremo a extremo del nanoinformador, esto es, la distancia entre los dos extremos del nanoinformador, y  $\langle R \rangle$  como el vector de extremo a extremo medio de manera que 95% de R estará dentro de  $2\langle R \rangle$  en una solución considerada apropiada por un experto en la técnica. Las soluciones ilustrativas incluyen, por ejemplo, una solución diluida del nanoinformador en agua o en un tampón de pH. Opcionalmente, un nanoinformador está en un estado extendido cuando R es mayor de  $2,0\langle R \rangle$ .

"Estado orientado" hace referencia a un nanoinformador en un estado que sería reconocido como orientado por un experto en la técnica. Un nanoinformador puede estar en un estado orientado cuando está orientado con respecto a

su conformación nativa en solución. El nanoinformador puede estar orientado cuando está dispuesto en paralelo con el campo de fuerza capaz de orientar el nanoinformador. El nanoinformador puede estar orientado cuando es uno de una pluralidad de nanoinformadores que están dispuestos en paralelo, como reconocen los expertos en la técnica.

### 5.12.1 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN SELECTIVA

5 Como se ha descrito más arriba, los autores de la presente invención describen métodos para la inmovilización selectiva de un nanoinformador en un estado extendido. El nanoinformador, una vez inmovilizado selectivamente, puede ser utilizado para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica.

10 El nanoinformador puede ser cualquier polímero conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el nanoinformador puede ser un polisacárido, un polipéptido o un polinucleótido. Los polinucleótidos útiles incluyen ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos y otros polinucleótidos conocidos por los expertos en la técnica.

15 El nanoinformador puede tener cualquier tamaño que sea suficiente para permitir la extensión y la inmovilización del nanoinformador de acuerdo con los métodos de la invención. En ciertas realizaciones cuando el nanoinformador es un polinucleótido, el nanoinformador puede tener una longitud de más de 500 pb, más de 750 pb, más de 1 kb, más de 1,5 kb, más de 2,0 kb, más de 2,5 kb, más de 3,0 kb, más de 4,0 kb o más de 5,0 kb. En ciertas realizaciones, cuando el nanoinformador es un polipéptido, el nanoinformador puede tener un tamaño de más de 50 aminoácidos, más de 100 aminoácidos, más de 200 aminoácidos, más de 300 aminoácidos, más de 400 aminoácidos, más de 500 aminoácidos, más de 750 aminoácidos, más de 1000 aminoácidos, más de 1500 aminoácidos, más de 2000 aminoácidos, más de 2500 aminoácidos, más de 3000 aminoácidos, más de 4000 aminoácidos o más de 5000 aminoácidos. En ciertas realizaciones, cuando el nanoinformador es un polisacárido, el nanoinformador puede tener un tamaño de más de 50 sacáridos, más de 100 sacáridos, más de 200 sacáridos, más de 300 sacáridos, más de 400 sacáridos, más de 500 sacáridos, más de 750 sacáridos, más de 1000 sacáridos, más de 1500 sacáridos, más de 2000 sacáridos, más de 2500 sacáridos, más de 3000 sacáridos, más de 4000 sacáridos o más de 5000 sacáridos.

25 El nanoinformador puede ser un nanoinformador nativo como entienden los expertos en la técnica, o el nanoinformador puede ser un nanoinformador no nativo. Cuando el nanoinformador es un polipéptido, el nanoinformador puede comprender solamente aminoácidos de origen natural, o el nanoinformador puede comprender aminoácidos de origen natural y aminoácidos de origen no natural. Los demás aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido, o derivado o análogo de los mismos, conocidos por los expertos en la técnica. Cuando el nanoinformador es un polinucleótido, el polinucleótido puede comprender solamente nucleótidos de origen natural, o el polinucleótido puede comprender nucleótidos de origen natural y nucleótidos de origen no natural. Cuando el nanoinformador es un polisacárido, el polisacárido puede comprender solamente sacáridos de origen natural, o el polisacárido puede comprender sacáridos de origen natural y sacáridos de origen no natural. Los polímeros pueden comprender solamente monómeros no naturales. El nanoinformador puede comprender una pluralidad de clases de monómeros, tales como aminoácidos, nucleótidos y/o sacáridos.

35 Opcionalmente, el nanoinformador comprende solamente una cadena de monómeros conectada covalentemente, primaria. Por ejemplo, cuando el nanoinformador es un polipéptido, en ciertas realizaciones, el nanoinformador comprende solamente una cadena de aminoácidos primaria. Cuando el nanoinformador es un polinucleótido, el nanoinformador puede ser de hebra sencilla. El nanoinformador puede comprender dos cadenas de monómeros conectadas covalentemente, primarias. Por ejemplo, cuando el nanoinformador es un polipéptido, el nanoinformador puede comprender dos cadenas de aminoácidos primarias. Cuando el nanoinformador es un polinucleótido, el nanoinformador puede comprender dos hebras de polinucleótidos; el nanoinformador puede ser de doble hebra, en parte o en su totalidad. Adicionalmente, el nanoinformador puede comprender tres o más cadenas de monómeros conectadas covalentemente, primarias. Por ejemplo, cuando el nanoinformador es un polipéptido, el nanoinformador comprende opcionalmente tres cadenas de aminoácidos primarias. Cuando el nanoinformador es un polinucleótido, el nanoinformador comprende opcionalmente tres hebras de polinucleótidos. Por ejemplo, el nanoinformador puede comprender tres hebras F1, X y F2 donde una porción de la hebra X es complementaria a la hebra F1 y una porción de la hebra X es complementaria a la hebra F2. Se ilustra un ejemplo en la Figura 13A. Opcionalmente, el nanoinformador comprende más de tres cadenas de monómeros conectadas covalentemente, primarias.

50 Ventajosamente, un nanoinformador puede comprender una o más marcas que facilitan la detección, formación de imagen o identificación del nanoinformador mediante mecanismos conocidos por los expertos en la técnica. La marca puede ser cualquier radical detectable conocido por los expertos en la técnica. Las marcas ilustrativas para los nanoinformadores incluyen isótopos detectables, radioisótopos, fluoróforos, colorantes, enzimas, ligandos, receptores, antígenos, anticuerpos, lectinas, carbohidratos, secuencias de nucleótidos, y cualquier otra marca detectable evidente para los expertos en la técnica.

55 Un polinucleótido es opcionalmente un polímero de bases nucleotídicas naturales (p. ej. A, G, C, T, U) o sintéticas, o una combinación de ambas. El esqueleto del polinucleótido puede estar compuesto enteramente por enlaces fosfodiéster "nativos", o puede contener uno o más enlaces modificados, tales como uno o más enlaces fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato u otros enlaces modificados. Como ejemplo específico, un polinucleótido puede ser un ácido péptidonucleico (PNA), que contiene interenlaces amida. Los ejemplos adicionales de las bases

5 sintéticas y cadenas principales que se pueden utilizar junto con la invención, así como los métodos para su síntesis, se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.001.983; Uhlman & Peyman, 1990, Chemical Review 90(4):544 584; Goodchild, 1990, Bioconjugate Chem. 1(3):165 186; Egholm et al., 1992, J. Am. Chem. Soc. 114:1895 1897; Gryaznov et al., J. Am. Chem. Soc. 116:3143 3144, así como las referencias citadas en todas las anteriores. Las bases nucleotídicas sintéticas comunes de las cuales pueden estar compuestos los polinucleótidos incluyen 3-metiluracilo, 5,6-dihidouracilo, 4 tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 6-dimetilaminopurina, 6-metilaminopurina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 6-amino-8-bromopurina, inosina, 5-metilcitosina, 7-desazaadenina, y 7-desazaguanosina. Los ejemplos no limitantes adicionales de las bases nucleotídicas sintéticas de las cuales pueden estar compuestos el ácido nucleico diana se pueden encontrar en Fasman, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 1985, págs. 385-392; Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie, Springer Verlag, Berlin y Chemical Abstracts, todos los cuales proporcionan referencias a publicaciones que describen las estructuras, propiedades y preparación de tales nucleobases.

15 El nanoinformador se puede preparar de acuerdo con cualquier mecanismo evidente para los expertos en la técnica. Ventajosamente, los nanoinformadores de acuerdo con la invención pueden comprender marcas y/o miembros de pares de unión, como se describe en las secciones de más abajo, que se pueden utilizar para facilitar la preparación y/o purificación del nanoinformador. Además, ciertos nanoinformadores de la invención son capaces de formar complejos con moléculas que comprenden miembros de los pares de unión, como se describe más abajo. Estos complejos se pueden utilizar para facilitar la preparación y/o la purificación del nanoinformador o complejo.

### 5.12.2 INMOVILIZACIÓN DE LA PRIMERA PORCIÓN

20 En los métodos de la invención, se inmoviliza una primera porción del nanoinformador. Generalmente, la primera porción está inmovilizada si puede ser reconocida como inmovilizada por un experto en la técnica. La primera porción puede ser inmovilizada mediante cualquier mecanismo evidente para los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la técnica para la inmovilización de la primera porción del nanoinformador no es crítica para los métodos de la invención.

25 La primera porción del nanoinformador puede estar en cualquier localización del nanoinformador. En ciertas realizaciones, la primera porción está en un extremo del nanoinformador. Para los fines de la invención y de esta descripción en general, una porción de un nanoinformador puede estar en "un extremo" cuando hay menos de cinco, tres, dos, uno o cero monómeros desde un extremo del nanoinformador. Por supuesto, aunque muchos nanoinformadores tienen dos extremos, los métodos descritos en la presente memoria son aplicables a nanoinformadores que tienen más de dos extremos y a nanoinformadores que tienen uno o cero extremos, p. ej. nanoinformadores circulares. La primera porción no está necesariamente en un extremo del nanoinformador.

30 El nanoinformador puede ser inmovilizado sobre cualquier sustrato evidente para los expertos en la técnica. El sustrato puede ser cualquier radical al cual puede ser inmovilizado el nanoinformador sin limitación. Opcionalmente, el sustrato es una superficie, membrana, cuenta, material poroso, electrodo o matriz.

35 En algunos ejemplos, la primera porción del nanoinformador puede ser inmovilizada no selectivamente. En ejemplos adicionales, la primera porción del nanoinformador puede ser inmovilizada selectivamente. En ejemplos ventajosos, después de inmovilizar la primera porción del nanoinformador, alguna porción del nanoinformador debe estar libre para moverse suficientemente de manera que el nanoinformador pueda ser extendido en las siguientes etapas del método. En particular, en ciertas realizaciones, cuando la primera porción del nanoinformador es inmovilizada no selectivamente, es importante que no todo el nanoinformador sea inmovilizado no selectivamente hasta un punto que evite la extensión de cualquier porción del nanoinformador.

40 La inmovilización puede ser por medio de cualquier interacción con el sustrato evidente para los expertos en la técnica. La inmovilización puede ser por medio de una interacción electrostática o iónica, por medio de uno o más enlaces covalentes, por medio de uno o más enlaces no covalentes o combinaciones de los mismos. En ciertos casos, la inmovilización puede ser por medio de una interacción electrostática con un electrodo. En otros casos, la inmovilización es por medio de una interacción electrostática con un sustrato distinto de un electrodo.

45 Opcionalmente, la primera porción del nanoinformador comprende un primer miembro de un par de unión. El primer miembro del par de unión puede estar unido covalentemente a la primera porción del nanoinformador, o pueden no estar unidos covalentemente. Los enlaces covalentes y los enlaces no covalentes útiles serán evidentes para los expertos en la técnica. Provechosamente, el sustrato sobre el que está unida la primera porción del nanoinformador comprenderá un segundo miembro del par de unión. El sustrato puede estar unido covalentemente al segundo miembro, o pueden estar unidos no covalentemente. La Figura 12A ilustra un nanoinformador que comprende un radical F1 que es capaz de unirse selectivamente a un radical del sustrato. El radical F1 puede ser, por ejemplo, biotina, susceptible de unión, por ejemplo, a un sustrato recubierto con avidina.

50 Opcionalmente, la primera porción del nanoinformador puede comprender un miembro de un par de unión que es capaz de unirse a un miembro de un par de unión sobre el sustrato para formar uno o más enlaces no covalentes. Los sustratos útiles ilustrativos incluyen aquellos que comprenden un radical de unión seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas, y anticuerpos. La primera

porción del nanoinformador comprendería un radical de unión capaz de unirse con el radical de unión del sustrato. Los sustratos útiles ilustrativos que comprenden radicales reactivos incluyen, pero no están limitados a, superficies que comprenden epoxi, aldehído, oro, hidrazida, sulfhidrilo, éster de NHS, amina, tiol, carboxilato, maleimida, hidroximetilfosfina, imidoéster, isocianato, hidroxilo, éster pentafluorofenílico, psoraleno, disulfuro de piridilo o vinilsulfona, o mezclas de los mismos. Tales superficies se pueden obtener de fuentes comerciales o se pueden preparar de acuerdo con las técnicas convencionales.

Ventajosamente, la primera porción del nanoinformador puede ser inmovilizada sobre el sustrato por medio de un par de unión de avidina-biotina. Opcionalmente, el nanoinformador puede comprender un radical de biotina en su primera porción. Por ejemplo, un polinucleótido nanoinformador puede comprender un residuo de nucleótido biotilado. De un modo similar, un nanoinformador polipeptídico puede comprender un residuo de aminoácido biotilado. El sustrato que comprende avidina puede ser cualquier sustrato que comprenda avidina conocido por los expertos en la técnica. Los sustratos útiles que comprenden avidina están disponibles en el mercado incluyendo TB0200 (Accelr8), SAD6, SAD20, SADIOO, SAD500, SAD2000 (Xantec), SuperAvidin (Array-It), portaobjetos con estreptavidina (núm. catálogo MPC 000, Xenopore) y STREPT AVIDINslide (núm. de catálogo 439003, Greiner Bio-one).

La primera porción del nanoinformador puede comprender una secuencia de nucleótidos que es capaz de unirse selectivamente a una secuencia de nucleótidos sobre el sustrato.

La primera porción del nanoinformador puede comprender avidina, y el sustrato puede comprender biotina. Los sustratos útiles que comprenden biotina se encuentran disponibles en el mercado incluyendo Optiarray-biotin (Accler8), BD6, BD20, BDIOO, BD.500 y BD2000 (Xantec).

La primera porción del nanoinformador puede ser capaz de formar un complejo con una o más moléculas distintas que, a su vez, son capaces de unirse, covalentemente o no covalentemente, a un radical de unión del sustrato. Por ejemplo, una primera porción del nanoinformador puede ser capaz de unirse selectivamente a otra molécula que comprende, por ejemplo, un radical de biotina que es capaz de unirse selectivamente, por ejemplo, a un radical de avidina del sustrato. La Figura 13A ilustra un nanoinformador que es capaz de unirse selectivamente a una segunda molécula X que es capaz de unirse selectivamente a una tercera molécula que comprende F1. F1 es capaz de unirse selectivamente a un radical sobre el sustrato. La Figura 13B ilustra un nanoinformador que es capaz de unirse selectivamente a una segunda molécula que comprende F1, y F1 es capaz de unirse selectivamente a un radical sobre el sustrato.

La primera porción del nanoinformador puede comprender un miembro de un par de unión que es capaz de reaccionar con un miembro de un par de unión sobre el sustrato para formar uno o más enlaces covalentes. Los sustratos útiles ilustrativos que comprenden grupos reactivos incluyen aquellos que comprenden un radical reactivo seleccionado del grupo que consiste en succinamidas, aminas, aldehídos, epoxis y tioles. La primera porción del nanoinformador comprendería un radical reactivo capaz de reaccionar con el radical reactivo del sustrato. Los sustratos útiles ilustrativos que comprenden radicales reactivos incluyen, pero no están limitados a, OptArray-DNA NHS group (Accler8), Nexterion Slide AL (Schott) y Nexterion Slide E (Schott).

La primera porción del nanoinformador puede comprender un radical reactivo que es capaz de estar unido al sustrato por medio de fotoactivación. El sustrato podría comprender el radical fotorreactivo, o la primera porción del nanoinformador podría comprender el radical fotorreactivo. Algunos ejemplos de radicales fotorreactivos incluyen arilazidas, tales como N-((2-piridilditio)etil)-4-azidosalicilamida; arilazidas fluoradas, tales como ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico; reactivos basados en benzofenona, tales como el éster de succinimidilo de ácido 4-benzoilbenzoico; y 5-Bromo-desoxiuridina.

La primera porción del nanoinformador puede ser inmovilizada sobre el sustrato por medio de otros pares de unión evidentes para los expertos en la técnica.

### 5.12.3 EXTENSIÓN DEL NANOINFORMADOR

En algunos métodos de la invención, los nanoinformadores que comprenden el par de sondas están en un estado extendido.

Generalmente, cualquier nanoinformador está en un estado extendido si fuera reconocido como tal por un experto en la técnica.

En ciertas realizaciones, el nanoinformador está en un estado extendido cuando está en un campo de fuerza capaz de extender el nanoinformador en condiciones adecuadas para extender el nanoinformador. Tales fuerzas y condiciones deben ser evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, muchos nanoinformadores pueden ser extendidos por medio de una fuerza hidrodinámica o de la gravedad, y muchos nanoinformadores cargados pueden ser extendidos por medio de una fuerza electromagnética. En ciertas realizaciones, la fuerza se puede aplicar al nanoinformador indirectamente. Por ejemplo, el nanoinformador puede comprender o puede estar unido, covalentemente o no covalentemente, a un radical capaz de ser movido por una fuerza. En ciertas realizaciones, el nanoinformador puede estar conectado a un radical.

En ciertas realizaciones, la fuerza es una fuerza electromagnética. Por ejemplo, cuando el nanoinformador está cargado, tal como un polinucleótido, el nanoinformador puede ser extendido en un campo eléctrico o magnético. El campo debe ser suficientemente fuerte para extender el nanoinformador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Las técnicas ilustrativas para extender un nanoinformador en un campo eléctrico o magnético son descritas por Matsuura et al., 2002, *J Biomol Struct Dyn.* 20(3):429-36; Ferree & Blanch, 2003, *Biophys J.* 85(4):2539-46; Stigter & Bustamante, 1998, *Biophys J.* 1998 75(3):1197-210; Matsuura et al., 2001, *Nucleic Acids Res.* 29(16); Ferree & Blanch, 2004, *Biophys J.* 87(1):468-75; cuyos contenidos se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

En ciertas realizaciones, la fuerza es una fuerza hidrodinámica. Por ejemplo, muchos nanoinformadores, incluyendo polisacáridos, polipéptidos, y polinucleótidos, pueden ser extendidos en un campo de un fluido en movimiento. La fuerza hidrodinámica debe ser suficientemente fuerte para extender el nanoinformador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Las técnicas ilustrativas para extender un nanoinformador en un campo hidrodinámico son descritas por Bensimon et al., 1994, en *Science* 265:2096-2098; Henegariu et al., 2001, en *BioTechniques* 31: 246-250; Kraus et al., 1997, en *Human Genetics* 99:374 - 380; Michalet et al., 1997, en *Science* 277:1518-1523; Yokota et al., 1997, en *Nucleic Acids Res.* 25(5):1064-70; Otobe et al., 2001, en *Nucleic Acids Research* 29:109; Zimmerman & Cox, 1994, en *Nucleic Acids Res.* 22(3):492-7, y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.548.255; 6.344.319; 6.303.296; 6.265.153; 6.225.055; 6.054.327; y 5.840.862, cuyos contenidos se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

En ciertas realizaciones, la fuerza es la gravedad. En realizaciones ventajosas, la fuerza de gravedad se puede combinar, por ejemplo, con la fuerza hidrodinámica para extender el nanoinformador. En ciertas realizaciones, la fuerza debe ser suficientemente fuerte para extender el nanoinformador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Las técnicas ilustrativas para extender un nanoinformador con la gravedad son descritas por Michalet et al, 1997, en *Science* 277:1518-1523; Yokota et al., 1997, en *Nucleic Acids Res.* 25(5); 1064-70; Kraus et al., 1997, en *Human Genetics* 99:374 - 380.

En realizaciones concretas, la fuerza se aplica por medio de un menisco en movimiento. Los expertos en la técnica reconocerán que un menisco en movimiento puede aplicar varias fuerzas a un nanoinformador incluyendo una fuerza hidrodinámica, una tensión superficial y cualquier otra fuerza reconocida por los expertos en la técnica. El menisco se puede mover mediante cualquier mecanismo evidente para los expertos en la técnica incluyendo evaporación y gravedad. Los mecanismos ilustrativos para extender un nanoinformador con un menisco en movimiento se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.548.255; 6.344.319; 6.303.296; 6.265.153; 6.225.055; 6.054.327; y 5.840.862.

En realizaciones concretas, el nanoinformador se puede extender por medio de una trampa óptica o de pinzas ópticas. Por ejemplo, el nanoinformador puede comprender o estar conectado, covalentemente o no covalentemente, a una partícula capaz de ser atrapada o movida por medio de una fuente apropiada de fuerza óptica. Las técnicas útiles para mover artículos con trampas ópticas o pinzas ópticas son descritas por Ashkin et al, 1986, en *Optics Letters* 11:288-290; Ashkin et al, 1987, en *Science* 235:1517-1520; Ashkin et al, en *Nature* 330:769-771; Perkins et al, 1994, en *Science* 264:822-826; Simmons et al, 1996, en *Biophysical Journal* 70:1813-1S22; Block et al., 1990, en *Nature* 348:348 - 352; y Grier, 2003, en *Nature* 424: 810-816.

En ciertas realizaciones, el nanoinformador se puede extender mediante combinaciones de las fuerzas anteriores que son evidentes para los expertos en la técnica. En los ejemplos, más abajo, ciertos nanoinformadores se estiran por medio de una combinación de un campo eléctrico y una fuerza hidrodinámica.

El nanoinformador está extendido cuando sea reconocido como extendido por un experto en la técnica de acuerdo con el criterio convencional para la extensión de un nanoinformador. En ciertas realizaciones, el nanoinformador está extendido cuando pierde la mayor parte de los rasgos de su estructura terciaria según reconocen los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoinformador está extendido cuando pierde la mayor parte de los rasgos de su estructura secundaria según reconocen los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoinformador está extendido cuando los rasgos de su estructura primaria son detectables en la secuencia cuando se forman imágenes de acuerdo con las técnicas convencionales. Las técnicas de formación de imágenes ilustrativas se describen en los ejemplos más abajo.

En ciertas realizaciones, se puede reconocer un estado extendido de un nanoinformador comparando su radio hidrodinámico con su radio hidrodinámico medio cuando está libre en una solución diluida. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un nanoinformador, o una de sus porciones, están extendidos cuando su radio hidrodinámico es mayor de alrededor del doble de su radio hidrodinámico medio en una solución diluida. Más cuantitativamente,  $R$  representa el radio hidrodinámico del nanoinformador, o una de sus porciones, y  $\langle R \rangle$  representa el radio hidrodinámico medio del nanoinformador, o una de sus porciones, en una solución diluida. El  $\langle R \rangle$  medio debe ser calculado de manera que  $R$  para el nanoinformador, o una de sus porciones, cuando no están unidos en solución diluida es menor de  $2\langle R \rangle$  95% del tiempo. En ciertas realizaciones, un nanoinformador, o una de sus porciones, está en un estado extendido cuando  $R$  es mayor de  $1,5\langle R \rangle$ , mayor de  $1,6\langle R \rangle$ , mayor de  $1,7\langle R \rangle$ , mayor de  $1,8\langle R \rangle$ , mayor de  $1,9\langle R \rangle$ , mayor de  $2,0\langle R \rangle$ , mayor de  $2,1\langle R \rangle$ , mayor de  $2,2\langle R \rangle$ , mayor de  $2,3\langle R \rangle$ , mayor de  $2,4\langle R \rangle$ ,

mayor de 2,5<R> o mayor de 3,0<R>. En realizaciones concretas, un nanoinformador, o una de sus porciones, están en un estado extendido cuando R es mayor de 2,0<R>.

#### 5.12.4 ORIENTACIÓN DEL NANOINFORMADOR

5 Opcionalmente, el nanoinformador está en un estado orientado. Generalmente, cualquier nanoinformador está en un estado orientado si es reconocido como tal por un experto en la técnica.

Por ejemplo, el nanoinformador está en un estado orientado cuando está en un campo de fuerza capaz de orientar el nanoinformador en condiciones adecuadas para orientar el nanoinformador. Tales fuerzas y condiciones deben ser evidentes para los expertos en la técnica.

10 La fuerza puede ser una fuerza electromagnética. Por ejemplo, cuando el nanoinformador está cargado, tal como un polinucleótido, el nanoinformador puede estar orientado en un campo eléctrico o magnético. El campo debe ser suficientemente fuerte para orientar el nanoinformador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Las técnicas ilustrativas para orientar un nanoinformador en un campo eléctrico o magnético se han descrito más arriba.

15 Alternativamente, la fuerza es una fuerza hidrodinámica. Por ejemplo, muchos nanoinformadores, incluyendo polisacáridos, polipéptidos, y polinucleótidos, pueden ser orientados en un campo de un fluido en movimiento. La fuerza hidrodinámica debe ser suficientemente fuerte para orientar el nanoinformador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Las técnicas ilustrativas para orientar un nanoinformador en un campo hidrodinámico se han descrito más arriba.

20 Alternativamente, la fuerza es la gravedad. Ventajosamente, la fuerza de la gravedad se puede combinar, por ejemplo, con la fuerza hidrodinámica para orientar el nanoinformador. En ciertos ejemplos, las fuerzas deben ser suficientemente fuertes para orientar el nanoinformador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Las técnicas ilustrativas para orientar un nanoinformador con la gravedad se han descrito más arriba.

Opcionalmente, el nanoinformador puede ser orientado por combinaciones de las fuerzas anteriores que son evidentes para los expertos en la técnica. En los ejemplos, más abajo, ciertos nanoinformadores se orientan por medio de una combinación de un campo eléctrico y una fuerza hidrodinámica.

25 El nanoinformador está orientado cuando es reconocido como orientado por un experto en la técnica de acuerdo con los criterios convencionales para la orientación de un nanoinformador. Por ejemplo, el nanoinformador está orientado cuando se dispone en paralelo, como reconocen los expertos en la técnica, con un campo de fuerza capaz de orientar el nanoinformador. En ciertos ejemplos, el nanoinformador está orientado cuando es uno de una pluralidad de nanoinformadores que están dispuestos en paralelo, como reconocen los expertos en la técnica. Por ejemplo,  
30 una pluralidad de nanoinformadores puede estar orientada cuando el vector de un primer extremo a un segundo extremo de un nanoinformador es paralelo, como reconocen los expertos en la técnica, a los vectores entre los correspondientes extremos de otros nanoinformadores de la pluralidad.

#### 5.12.5 INMOVILIZACIÓN SELECTIVA DE LA SEGUNDA PORCIÓN DEL NANOINFORMADOR

35 Como se ha comentado más arriba, en los métodos descritos en la presente memoria, se inmoviliza selectivamente una segunda porción del nanoinformador. La segunda porción del nanoinformador puede ser cualquier porción del nanoinformador que no sea idéntica a la primera porción del nanoinformador. Opcionalmente, la segunda porción del nanoinformador no se solapa con ninguna parte de la primera porción del nanoinformador.

40 Los autores de la presente invención describen métodos que comprenden la única etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoinformador mientras el nanoinformador está en un estado extendido u orientado, y mientras una primera porción del nanoinformador es inmovilizada. Los métodos ilustrativos para la inmovilización de la primera porción del nanoinformador, y para la extensión u orientación del nanoinformador se describen con detalle en las secciones anteriores.

45 Los autores de la presente invención también describen métodos que comprende la etapa de extender un nanoinformador, mientras una primera porción del nanoinformador está inmovilizada, y la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoinformador mientras el nanoinformador está en un estado extendido. Los métodos ilustrativos para la inmovilización de la primera porción del nanoinformador, y para la extensión del nanoinformador se describen con detalle en las secciones anteriores.

50 Los autores de la presente invención también describen métodos que comprenden la etapa de inmovilizar una primera porción de un nanoinformador, la etapa de extender el nanoinformador mientras la primera porción es inmovilizada y la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoinformador mientras el nanoinformador está en un estado extendido. Los métodos ilustrativos para la inmovilización de la primera porción del nanoinformador, y para la extensión del nanoinformador se describen con detalle más arriba. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos que comprenden la etapa de orientar un nanoinformador, mientras una primera porción del nanoinformador es inmovilizada, y la etapa de inmovilizar selectivamente una  
55 segunda porción de un nanoinformador mientras el nanoinformador está en un estado orientado. Los métodos

ilustrativos para la inmovilización de la primera porción del nanoinformador, y para orientar el nanoinformador se describen con detalle en las secciones anteriores.

5 Los autores de la presente invención también describen métodos que comprenden la etapa de inmovilizar una primera porción de un nanoinformador, la etapa de orientar el nanoinformador mientras la primera porción es inmovilizada y la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoinformador mientras el nanoinformador está en un estado orientado. Los métodos ilustrativos para la inmovilización de la primera porción del nanoinformador, y para orientar el nanoinformador se describen con detalle más arriba.

10 La inmovilización selectiva de la segunda porción del nanoinformador puede seguir cualquier técnica para la inmovilización selectiva de un nanoinformador evidente para los expertos en la técnica. De una manera significativa, en realizaciones ventajosas de la invención, la segunda porción del nanoinformador no está inmovilizada no selectivamente. La inmovilización selectiva puede permitir que el nanoinformador sea inmovilizado mientras está en un estado completamente extendido o en un estado casi completamente extendido. La inmovilización selectiva también puede permitir que el nanoinformador sea inmovilizado de una manera orientada. En otras palabras, la primera porción y la segunda porción del nanoinformador puede ser inmovilizada a lo largo de la dirección del campo o los campos utilizados para extender el nanoinformador, precediendo la primera porción a la segunda porción en el campo. Cuando una pluralidad de nanoinformadores está inmovilizada, puede estar orientada uniformemente a lo largo del campo.

15 La segunda porción del nanoinformador puede estar en cualquier localización del nanoinformador. Opcionalmente, la segunda porción está en un extremo del nanoinformador. Opcionalmente, la segunda porción no está en un extremo del nanoinformador. Opcionalmente, la primera porción, descrita en las secciones anteriores, está en un extremo del nanoinformador, y la segunda porción está en otro extremo del nanoinformador.

20 Como se ha comentado antes, la segunda porción del nanoinformador está inmovilizada selectivamente. La inmovilización puede ser por medio de cualquier interacción selectiva con el sustrato evidente para los expertos en la técnica. La inmovilización puede ser por medio de interacción electrostática o iónica, por medio de uno o más enlaces covalentes, por medio de uno o más enlaces no covalentes o combinaciones de los mismos. La inmovilización puede ser por medio de interacción electrostática con un electrodo. La inmovilización puede ser por medio de una interacción electrostática con un sustrato distinto de un electrodo.

25 Si la primera porción y la segunda porción del nanoinformador están inmovilizadas selectivamente sobre el mismo sustrato, las técnicas de inmovilización selectiva deben ser compatibles, por supuesto, con el sustrato. En particular, las técnicas de inmovilización son las mismas. Por ejemplo, sobre un sustrato recubierto con avidina, tanto la primera como la segunda porción del nanoinformador pueden ser inmovilizadas selectivamente por medio de interacciones biotina - avidina. Sin embargo, como resultará evidente para los expertos en la técnica, no es necesario utilizar la misma interacción en ambas porciones primera y segunda para la inmovilización sobre el mismo sustrato. Por ejemplo, el sustrato puede comprender múltiples radicales susceptibles de unión selectiva, o la primera porción puede ser inmovilizada no selectivamente, u otras técnicas evidentes para los expertos en la técnica.

30 Opcionalmente, la segunda porción del nanoinformador comprende un primer miembro de un par de unión. El segundo miembro del par de unión puede estar unido covalentemente a la segunda porción del nanoinformador, o pueden estar unidos no covalentemente. Los enlaces covalentes y los enlaces no covalentes útiles serán evidentes para los expertos en la técnica. Provechosamente, el sustrato sobre el cual está unida la segunda porción del nanoinformador comprenderá un segundo miembro del par de unión. El sustrato puede estar unido covalentemente al segundo miembro, o pueden estar unidos no covalentemente.

35 La segunda porción del nanoinformador puede comprender un miembro de un par de unión que es capaz de unirse con un miembro de un par de unión sobre el sustrato para formar uno o más enlaces no covalentes. Los sustratos útiles ilustrativos incluyen aquellos que comprenden un radical de unión seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas, y anticuerpos tales como los descritos en las secciones anteriores.

40 Ventajosamente, la segunda porción del nanoinformador puede ser inmovilizada sobre el sustrato a través de un par de unión de avidina-biotina. El nanoinformador puede comprender un radical de biotina en su primera porción. Por ejemplo, un nanoinformador de polinucleótido puede comprender un residuo de nucleótido biotinilado. De un modo similar, un nanoinformador de polipéptido puede comprender un residuo aminoácido biotinilado. Los sustratos útiles que comprenden avidina se describen en las secciones anteriores.

45 Opcionalmente, la segunda porción del nanoinformador puede comprender avidina, y el sustrato puede comprender biotina. Los sustratos útiles que comprenden biotina se describen en las secciones anteriores.

50 Opcionalmente, la segunda porción del nanoinformador puede comprender un miembro de un par de unión que es capaz de reaccionar con un miembro de un par de unión sobre el sustrato para formar uno o más enlaces covalentes. Los sustratos útiles ilustrativos que comprenden grupos reactivos se describen en las secciones anteriores.

La segunda porción del nanoinformador puede comprender un radical reactivo que es capaz de ser unido al sustrato por medio de fotoactivación. El sustrato podía comprender el radical fotorreactivo, o la segunda porción del nanoinformador podía comprender el radical fotorreactivo. Algunos ejemplos de radicales fotorreactivos incluyen arilazidas, tales como *N*-((2-piridilil)etil)-4-azidosalicilamida; arilazidas fluoradas, tales como ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico; reactivos con una base de benzofenona, tales como éster succinimidílico de ácido 4-benzoilbenzoico; y 5-Bromo-desoxiuridina.

Alternativamente, la segunda porción del nanoinformador puede ser inmovilizada sobre el sustrato por medio de otros pares de unión descritos en las secciones anteriores.

Alternativamente, la segunda porción del nanoinformador es capaz de formar un complejo con una o más moléculas distintas que, a su vez, son capaces de unirse, covalentemente o no covalentemente, a un radical de unión del sustrato. Por ejemplo, la segunda porción del nanoinformador puede ser capaz de unirse selectivamente a otra molécula que comprende, por ejemplo, un radical de biotina que es capaz de unirse selectivamente, por ejemplo, a un radical de avidina del sustrato. La Figura 12B ilustra un nanoinformador de unión selectiva a una segunda molécula que comprende F3 que es, a su vez, capaz de unirse selectivamente a un radical sobre un sustrato. La interacción entre la segunda porción del nanoinformador y la molécula que comprende F3 puede estar mediada, por ejemplo, por una interacción antígeno-anticuerpo.

Las FIGS. 14A y 14B ilustran la inmovilización selectiva de un nanoinformador de acuerdo con los métodos de la presente invención. En la Figura 14A, una primera porción del nanoinformador comprende la unión del radical F1 que es capaz de unirse selectivamente a un radical sobre el sustrato S ilustrado. El radical de unión F1 puede ser, por ejemplo, biotina, y el sustrato S puede ser recubierto, por ejemplo, con avidina. El nanoinformador de la Figura 14A es extendido por una fuerza como se ha descrito en las secciones anteriores. En la Figura 14B, la fuerza es un potencial eléctrico. Mientras se extiende, el nanoinformador se pone en contacto con moléculas que comprenden el radical de unión F2 que es capaz de unirse selectivamente a un radical de unión sobre el sustrato ilustrado S. El radical de unión F2 puede ser, por ejemplo, biotina, y el sustrato S puede ser recubierto, por ejemplo, con avidina. De una manera significativa, hasta tres moléculas que comprenden F2 son capaces de unirse selectivamente a una segunda porción del nanoinformador para inmovilizarlo selectivamente en su estado extendido. Como se ilustra, las moléculas comprenden un segundo radical de unión que se une selectivamente a un radical de unión repetido del nanoinformador. Los radicales de unión pueden ser, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico complementarias, como se ilustra en la Figura 14B. El nanoinformador resultante se inmoviliza selectivamente en un estado extendido y debe permanecer extendido incluso cuando se retira la fuerza. El nanoinformador extendido, inmovilizado selectivamente, se puede utilizar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica.

#### 5.12.6 INMOVILIZACIÓN DE DOS PORCIONES DE UN NANOINFORMADOR EXTENDIDO U ORIENTADO

También se describen en la presente memoria los métodos para la inmovilización selectiva de una primera porción y una segunda porción de un nanoinformador que está en estado extendido u orientado. De una manera significativa, de acuerdo con estos métodos, no es necesario que el nanoinformador sea inmovilizado antes de la aplicación de una fuerza capaz de extender u orientar el nanoinformador.

En estos métodos, el nanoinformador es extendido u orientado, o ambos, por una fuerza capaz de extender u orientar el nanoinformador. Tales fuerzas se describen con detalle en las secciones anteriores. La fuerza es una fuerza capaz de extender u orientar el nanoinformador mientras se mantiene el nanoinformador en una localización, esto es, una fuerza capaz de extender u orientar sin mover sustancialmente el nanoinformador. Las fuerzas ilustrativas incluyen campos electromagnéticos oscilantes y campos hidrodinámicos oscilantes. En un método concreto, la fuerza es un campo eléctrico oscilante. Las técnicas ilustrativas para extender u orientar un nanoinformador en un campo eléctrico oscilante son descritas por Asbury et al, 2002, en *Electrophoresis* 23(16):2658-66; Kabata et al, 1993, en *Science* 262(5139):1561-3; y Asbury and van den Engh, 1998, en *Biophys J.* 74:1024-30.

En los métodos, el nanoinformador es inmovilizado en una primera porción y una segunda porción mientras está extendido u orientado. Tanto la primera porción como la segunda porción pueden ser inmovilizadas no selectivamente, ambas pueden ser inmovilizadas selectivamente, o una puede ser inmovilizada selectivamente y la otra no selectivamente. Las técnicas para la inmovilización de la primera porción y la segunda porción se describen con detalle en las secciones anteriores.

#### 5.12.7 SUSTRATO PARA LA INMOVILIZACIÓN

En los métodos comentados en la presente memoria, el sustrato para la inmovilización puede ser cualquier sustrato capaz de unirse selectivamente al nanoinformador evidente para los expertos en la técnica. Adicionalmente, los autores de la presente invención describen composiciones que comprenden un nanoinformador inmovilizado selectivamente en un estado extendido. Las composiciones comprenden un sustrato, como se describe en la presente memoria, que tiene inmovilizado un nanoinformador en un estado extendido. El nanoinformador puede ser, por supuesto, inmovilizado de acuerdo con un método de la invención.



El único requerimiento del sustrato es que sea capaz de unirse selectivamente a la segunda porción del nanoinformador como se ha descrito antes. De este modo, el sustrato puede ser un filtro o una membrana, tal como nitrocelulosa o nailon, vidrio, un polímero tal como poliacrilamida, un gel tal como agarosa, dextrano, celulosa, poliestireno, látex, o cualquier otro material conocido por los expertos en la técnica sobre el cual se pueden inmovilizar compuestos de captura. El sustrato puede estar compuesto por un material poroso tal como un material acrílico, copolímero de estireno/metacrilato de metilo y etileno/ácido acrílico.

El sustrato puede adoptar cualquier forma con tal que no evite la inmovilización selectiva de la segunda porción del nanoinformador. Por ejemplo, el sustrato puede adoptar la forma de un disco, una tableta, una tira, una cuenta, una partícula submicrónica, una cuenta magnética recubierta, un lecho de gel, un pocillo de microtitulación, un portaobjetos, una membrana, una frita u otra forma conocida por los expertos en la técnica. El sustrato está opcionalmente dispuesto en un alojamiento, tal como una columna de cromatografía, una columna de centrifugación, un cilindro de jeringa, una pipeta, una punta de pipeta, una placa de 96 o 384 pocillos, un microcanal, un capilar, etc., que ayuda al flujo de líquido sobre o a través del sustrato.

El nanoinformador puede ser inmovilizado sobre un único sustrato o sobre una pluralidad de sustratos. Por ejemplo, la primera y segunda porciones del nanoinformador pueden ser inmovilizadas sobre el mismo sustrato, como reconocen los expertos en la técnica. La primera porción del nanoinformador puede ser inmovilizada sobre un primer sustrato mientras la segunda porción del nanoinformador puede ser inmovilizada sobre un segundo sustrato, distinto del primero.

El sustrato se puede preparar de acuerdo con cualquier método evidente para los expertos en la técnica. Para una revisión de la miríada de técnicas que se pueden utilizar para activar los sustratos ilustrativos de la invención con una densidad suficiente de grupos reactivos, véanse, Wiley Encyclopedia of Packaging Technology, 2ª Ed., Brody & Marsh, Ed., "Surface Treatment," págs. 867-874, John Wiley & Sons (1997), y las referencias allí citadas. Los métodos químicos adecuados para generar grupos amino sobre sustratos de óxido de silicio son descritos por Atkinson & Smith, en "Solid Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides by the Phosphite Triester Method," En: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, M J Gait, Ed., 1984, IRL Press, Oxford, concretamente en las págs. 45-49 (y las referencias allí citadas); los métodos químicos adecuados para generar grupos hidroxilo sobre sustratos de óxido de silicio son descritos por Pease et al., 1994, en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5022-5026 (y las referencias allí citadas); los métodos químicos para generar grupos funcionales sobre polímeros tales como poliestireno, poliamidas y poliestirenos injertados son descritos por Lloyd Williams et al., 1997, en Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Capítulo 2, CRC Press, Boca Raton, FL (y las referencias allí citadas).

Los sustratos útiles ilustrativos incluyen superficies recubiertas con estreptavidina, p. ej. Accelr8 TB0200. Los sustratos útiles adicionales incluyen superficies útiles recubiertas con N-hidroxisuccinimida que son capaces de reaccionar con una porción de un nanoinformador que comprende una amina. Una de tales superficies es OptArray-DNA (Accelr8). Otras superficies útiles están recubiertas con aldehído (p. ej. Nexterion Slide AL., Schott) y hay superficies recubiertas con epoxi (p. ej. Nexterion Slide E, Schott). Otra superficie útil es una superficie recubierta con BSA biotilada útil para la inmovilización selectiva de una porción de un nanoinformador que comprende avidina o estreptavidina.

#### **5.12.8 MÉTODOS DE USO DE NANOINFORMADORES ESTIRADOS U ORIENTADOS INMOVILIZADOS SELECTIVAMENTE**

Los nanoinformadores elongados, inmovilizados selectivamente se pueden utilizar para crear códigos de barras macromoleculares para la separación y la detección secuencial de marcas. Estas marcas espaciadas a lo largo de la molécula proporcionan un código único que puede ser leído cuando el nanoinformador es extendido e inmovilizado. La extensión e inmovilización selectivas pueden facilitar la descodificación del código de barras macromolecular.

Los nanoinformadores elongados, inmovilizados selectivamente se pueden utilizar adicionalmente en cualquier contexto en el que pueda ser útil la detección o la formación de imágenes de un nanoinformador. Estos se pueden utilizar para fines diagnósticos, pronósticos, terapéuticos y de escrutinio. Por ejemplo, se pueden aplicar al análisis de muestras biomoleculares obtenidas o derivadas de un paciente con el fin de determinar si se encuentra presente un tipo de célula enferma en la muestra y/o para determinar la fase en la que se encuentra la enfermedad. Se pueden utilizar para diagnosticar infecciones por patógenos, por ejemplo infecciones por bacterias y virus intracelulares, determinando la presencia y/o cantidad de marcadores de bacteria o virus, respectivamente, en la muestra. Las composiciones y métodos de la invención se pueden utilizar para cuantificar moléculas diana cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o un estado de enfermedad, por ejemplo, marcadores sanguíneos que están regulados al alza o a la baja como resultado de un estado de enfermedad. Además, las composiciones y métodos de la invención se pueden utilizar para proporcionar información pronóstica que ayude a determinar el ciclo de tratamiento para un paciente.

### 5.12.9 KITS QUE COMPREDEN NANOINFORMADORES EXTENDIDOS U ORIENTADOS, INMOVILIZADOS SELECTIVAMENTE

Los autores de la presente invención también describen kits que comprenden uno o más componentes de la invención. Los kits pueden comprender, por ejemplo, un sustrato de acuerdo con la invención y uno o más nanoinformadores extendidos u orientados o ambos, inmovilizados selectivamente sobre el sustrato. Los kits se pueden utilizar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica, incluyendo, los descritos más arriba.

Además, los autores de la presente invención describen kits útiles para la extensión e inmovilización selectiva de nanoinformadores. Los kits pueden comprender un sustrato para la inmovilización y uno o más compañeros de unión para facilitar la extensión o la inmovilización de un nanoinformador. Los compañeros de unión podrían comprender un radical útil para la extensión del nanoinformador en una fuerza apropiada. En ciertas realizaciones, los compañeros de unión podrían facilitar la inmovilización o la inmovilización selectiva del nanoinformador en la superficie. El kit podría comprender un nanoinformador para la extensión e inmovilización. El kit podría comprender un dispositivo capaz de extender el nanoinformador.

### 5.13 DETECCIÓN DE NANOINFORMADORES

Los nanoinformadores se detectan mediante cualquiera de los métodos disponibles en la técnica que sea capaz de detectar las señales específicas sobre un nanoinformador dado. Cuando el nanoinformador está marcado fluorescentemente, se pueden investigar la consideración adecuada de fuentes de excitación apropiadas. Las posibles fuentes pueden incluir, pero no están limitadas a, lámparas, lámparas de xenón, láseres, diodos emisores de luz o alguna combinación de los mismos. La fuente de excitación apropiada se utiliza junto con un sistema de detección óptica apropiado, por ejemplo un microscopio invertido de fluorescencia, un microscopio epi-fluorescente o un microscopio confocal. Preferiblemente, se utiliza un microscopio que pueda permitir la detección con una resolución espacial suficiente para determinar la secuencia de las manchas del nanoinformador.

#### 5.13.1 SELECCIÓN DEL MICROSCOPIO Y DE LALENTE DEL OBJETIVO

La principal consideración referente a la lente del objetivo del microscopio es con la resolución óptica, que se determina mediante su apertura numérica (AN). Generalmente, a mayor AN, mejor resolución óptica. La AN requerida es preferiblemente al menos 1,07 basándose en la relación de  $[\Delta] = 0,617 \lambda / AN$  ( $[\Delta]$  = resolución óptica y  $\lambda$  = longitud de onda). La cantidad de luz que es recogida por el objetivo se determina mediante  $AN^2 \propto A$  ( $A$  = aumento del objetivo). Por lo tanto, con el fin de recoger tanta luz como sea posible, se deben seleccionar objetivos con AN elevada y pocos aumentos.

#### 5.13.2 SELECCIÓN DE LA CÁMARA CCD Y TÉCNICAS DE CAPTURA DE LA IMAGEN

Cuando se selecciona una cámara CCD, la primera consideración es el tamaño del píxel, que determina parcialmente la resolución final del sistema de formación de la imagen. Óptimamente la resolución óptica no debe ser comprometida por la cámara CCD. Por ejemplo, si la resolución óptica es de 210-300 nm, lo que corresponde a 12,6-18  $\mu\text{m}$  en un chip CCD después de un aumento 60 x, con el fin de resolver y mantener la resolución óptica debe ser de al menos dos píxeles para muestrear cada mancha. O el tamaño del píxel del chip CCD debe ser a lo sumo 6,3- 9  $\mu\text{m}$ .

La segunda consideración es la sensibilidad de la detección que se puede determinar por medio de muchos factores que incluyen, pero no están limitados a, el tamaño del píxel, la eficacia cuántica, el ruido de lectura y el ruido base. Para lograr una sensibilidad elevada, se selecciona una cámara cualitativa con un tamaño del píxel grande (que puede proporcionar una zona de recepción grande), una elevada eficacia cuántica y poco ruido. Una cámara ilustrativa con estos criterios es la cámara Orca-Ag de Hamamatsu Inc. El tamaño del chip es de 1344 x 1024 píxeles; cuando se utiliza el objetivo 60x, el campo de visión es de 144 x 110  $\mu\text{m}$ .

### 5.14 SISTEMAS COMPUTARIZADOS

Los autores de la presente invención también describen sistemas computarizados para informatizar la recogida de imágenes del nanoinformador, la identificación del nanoinformador y/o la decodificación del código del nanoinformador. Específicamente, los autores de la presente invención describen varios sistemas computarizados que comprenden un procesador y una memoria acoplada al procesador y que codifica uno o más programas. Los sistemas computarizados se pueden conectar a los microscopios empleados en la formación de imágenes del nanoinformador, permitiendo la formación de la imagen, la identificación y la decodificación del nanoinformador, así como el almacenamiento de la imagen del nanoinformador y la información asociada, por medio de un único aparato. Los uno o más programas codificados por la memoria hacen que el procesador realice los métodos de la invención.

Los autores de la presente invención también describen productos para programas computarizados para su uso junto con un sistema computarizado (p. ej., uno de los sistemas computarizados de la invención descritos más arriba) que tienen un procesador y una memoria conectada al procesador. Los productos para programas

computarizados de la invención comprenden un medio de almacenamiento legible con ordenador que tiene un mecanismo para el soporte lógico computarizado codificado o integrado en él. El mecanismo del soporte lógico del ordenador se puede cargar en la memoria del ordenador y hacer que el ordenador ejecute las etapas de los métodos de la invención.

5 Los métodos descritos en las subsecciones previas se pueden implementar preferiblemente mediante el uso de los siguientes sistemas computarizados, y de acuerdo con los siguientes métodos. Un sistema computarizado ilustrativo adecuado para la implementación de los métodos de la invención comprende componentes internos y están conectados a componentes externos. Los componentes internos de este sistema computarizado incluyen un elemento procesador interconectado con la memoria principal. Por ejemplo, el sistema computarizado puede ser un  
10 procesador basado en Intel Pentium de 200 MHz o una frecuencia de reloj mayor y con 32 MB o más de memoria principal.

Los componentes externos incluyen almacenamiento masivo. Este almacenamiento masivo puede ser uno o más discos duros que están típicamente empaquetados con el procesador y la memoria. Tales discos duros tienen típicamente una capacidad de almacenamiento de 1 GB o mayor. Otros componentes externos incluyen dispositivos de interfaz del usuario, que pueden ser un monitor y un teclado, junto con un puntero, que puede ser un "ratón", u otros dispositivos de entrada gráfica (no ilustrados). Típicamente, el sistema computarizado también está conectado a una conexión de red, que puede ser parte de una conexión Ethernet u otros sistemas computarizados locales, sistemas computarizados remotos, o redes de comunicación de área amplia, tales como internet. Esta conexión de red permite que el sistema computarizado comparta datos y procese tareas con otros sistemas computarizados.

20 Cargados en la memoria durante el funcionamiento de este sistema se encuentran varios componentes del soporte lógico, que son tanto convencionales en la técnica como especiales para la presente descripción. Estos componentes del soporte lógico hacen en conjunto que el sistema computarizado funcione de acuerdo con los métodos comentados en la presente memoria. Los componentes del soporte lógico se almacenan típicamente en el almacenamiento masivo. Un primer componente del soporte lógico es un sistema operativo, que es responsable del  
25 manejo del sistema computarizado y sus interconexiones de red. Este sistema operativo puede ser, por ejemplo, de la familia Microsoft Windows(R), tal como Windows 95, Windows 2000, o Windows XP o, alternativamente, un sistema operativo Macintosh, un sistema operativo Linux o un sistema operativo Unix. Un segundo componente del soporte lógico puede incluir lenguajes comunes y funciones convenientemente presentes en el sistema para ayudar a los programas que implementan los métodos específicos de esta invención. Los lenguajes que se pueden utilizar para programar los métodos analíticos de la invención incluyen, por ejemplo, C, C++, JAVA, y, menos preferiblemente, FORTRAN, PASCAL5 y BASIC. Otro componente del soporte lógico de la presente invención comprende los métodos analíticos de esta invención programados en un lenguaje procedimental o un paquete simbólico.

35 En una implementación ilustrativa, se carga primero un código de un nanoinformador (esto es, la correlación entre el orden y la naturaleza de las manchas sobre un nanoinformador y la identidad de una molécula diana a la cual se une el nanoinformador) en el sistema computarizado. A continuación el usuario ocasiona la ejecución del soporte lógico de análisis que realiza las etapas de determinación de la presencia y, opcionalmente, la cantidad de los nanoinformadores con un código de nanoinformador dado.

40 Los sistemas analíticos también incluyen productos de programas de ordenador que contienen uno o más de los componentes del soporte lógico descritos más arriba de manera que los componentes del soporte lógico pueden ser cargados en la memoria de un sistema computarizado. Específicamente, un producto de un programa computarizado de la invención incluye un medio de almacenamiento legible con ordenador que tiene uno o más mecanismos del programa de ordenador integrados o codificados en él en un formato legible con ordenador. El mecanismo del programa de ordenador codificado, p. ej., uno o más de los componentes del soporte lógico analítico  
45 descritos más arriba pueden ser cargados en la memoria del sistema computarizado y hacer que el procesador del sistema computarizado ejecute los métodos analíticos de la presente invención.

Los mecanismos del programa computarizado o los mecanismos son almacenados o codificados preferiblemente en el medio de almacenamiento legible con el ordenador. Los medios de almacenamiento legibles con el ordenador se comentan más arriba e incluyen pero no está limitados a: un disco duro, que puede ser, p. ej., un disco duro externo o interno de un sistema computarizado de la invención, o un disco duro extraíble; un disco flexible; un CD-ROM; o una cinta tal como una cinta DAT. Otros medios de almacenamiento legibles con ordenador también serán evidentes para los expertos en la técnica que pueden ser utilizados en los mecanismos del programa de ordenador descritos en la presente memoria.

55 Los autores de la presente invención también describen en la presente memoria bases de datos útiles para poner en práctica los métodos de la presente invención. Las bases de datos pueden incluir códigos de nanoinformadores de referencia para una gran variedad de moléculas diana. Preferiblemente, dichas bases de datos tendrán una forma electrónica que pueda ser cargada en un sistema computarizado. Tales formas electrónicas incluyen bases de datos cargadas en la memoria principal de un sistema computarizado utilizado para implementar los métodos de esta invención, o en la memoria principal de otros ordenadores conectados mediante conexión de red, o integrados o

codificados en medios de almacenamiento masivos, o en medios de almacenamiento extraíbles tales como un CD-ROM o un disco flexible.

## 5.15 APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA DE NANOINFORMADORES

5 Las composiciones y los métodos de la invención son para utilizarlos con fines diagnósticos, pronósticos, terapéuticos y de escrutinio. La presente invención proporciona la ventaja de que se pueden analizar muchas moléculas diana diferentes de una vez a partir de una única muestra biomolecular utilizando los métodos de la invención. Esto permite, por ejemplo, realizar varios ensayos diagnósticos en una muestra.

### 5.15.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS/PROGNÓSTICOS

10 Los presentes métodos se puede aplicar al análisis de muestras biomoleculares obtenidas o derivadas de un paciente con el fin de determinar si está presente un tipo de célula enferma en la muestra y/o para determinar la fase de una enfermedad.

Por ejemplo, se puede analizar una muestra de sangre de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para determinar la presencia y/o cantidad de marcadores de un tipo de células cancerosas en la muestra, diagnosticando o determinado de ese modo la fase del cáncer.

15 De manera alternativa, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para diagnosticar infecciones por patógenos, por ejemplo infecciones por bacterias y virus intracelulares, determinando la presencia y/o cantidad de marcadores de bacterias o virus, respectivamente, en la muestra.

20 De este modo, las moléculas diana detectadas utilizando las composiciones y métodos de la invención pueden ser o bien marcadores del paciente (tales como un marcador canceroso) o bien marcadores de infección con un agente foráneo, tales como marcadores bacterianos o virales.

Debido a la naturaleza cuantitativa de los nanoinformadores, las composiciones y los métodos de la invención pueden ser utilizados para cuantificar moléculas diana cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o un estado de enfermedad, por ejemplo, marcadores sanguíneos que están regulados al alza o regulados a la baja como resultado de un estado de enfermedad.

25 Además, las composiciones y los métodos de la invención se pueden utilizar para proporcionar información pronóstica que ayude en la determinación del ciclo de un tratamiento para un paciente. Por ejemplo, la cantidad de un marcador concreto para un tumor puede ser cuantificada exactamente incluso a partir una pequeña muestra de un paciente. Para ciertas enfermedades como el cáncer de mama, la expresión en exceso de ciertos genes, tales como Her2-neu, indica que se necesitará un ciclo más agresivo de tratamiento.

### 30 5.15.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS PATOLÓGICAS

35 El ARN extraído de muestras tisulares embebidas en parafina fijadas con formaldehído o paraformaldehído es típicamente de poca calidad (fragmentado) y tiene un bajo rendimiento. Esto hace extremadamente difícil y a menudo completamente inviable el análisis de la expresión génica de genes de baja expresión en muestras histológicas o tejidos de patología a archivar. La tecnología de nanoinformadores puede satisfacer esta necesidad no cubierta permitiendo el análisis de cantidades muy pequeñas de ARN total de baja calidad.

40 Para utilizar la tecnología de nanoinformadores en dicha aplicación, se puede extraer el ARN total de muestras de tejido embebidas en parafina fijadas con formaldehído o paraformaldehído (o similares) utilizando kits disponibles en el mercado tales como RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion) siguiendo los protocolos del fabricante. El ARN de tales muestras es frecuentemente degradado a fragmentos pequeños (200 a 500 nucleótidos de longitud), y muchas muestras de histología embebidas en parafina solamente proporcionan decenas de nanogramos de ARN total. Se pueden utilizar pequeñas cantidades (5 a 100 ng) de esta ARN total fragmentado directamente como material diana en una hibridación con nanoinformador siguiendo las condiciones de análisis descritas en la presente memoria. Como se describe en el Ejemplo 6 en la Sección 11 de más abajo, el análisis con nanoinformador de aproximadamente 3,3 ng de ARN celular permitió la detección de transcritos presentes a aproximadamente 0,5 copias/célula.

### 45 5.15.3 MÉTODOS DE ESCRUTINIO

50 Los métodos de la presente invención se pueden utilizar, entre otros, en la determinación del efecto de una perturbación, incluyendo compuestos químicos, mutaciones, cambios de temperatura, hormonas de crecimiento, factores de crecimiento, enfermedades, o cambios en las condiciones de cultivo, sobre diversas moléculas diana, identificando de ese modo las moléculas diana cuya presencia, ausencia o niveles son indicativos de un estado biológico concreto. Opcionalmente, los métodos se utilizan para dilucidar y descubrir los componentes y las rutas de los estados de enfermedad. Por ejemplo, la comparación de las cantidades de moléculas diana presentes en un tejido enfermo con el tejido "normal" permite dilucidar las moléculas diana importantes implicadas en la enfermedad,

identificando de ese modo las dianas para el descubrimiento/escrutinio de nuevos fármacos candidato que se pueden utilizar para tratar la enfermedad.

### 5.16 KITS

5 Los autores de la presente invención describen kits que comprenden uno o más componentes de la invención. Los kits pueden contener nanoinformadores pre-marcados, o nanoinformadores no marcados con uno o más componentes para marcar los nanoinformadores. Por otra parte, los nanoinformadores proporcionados en un kit pueden tener o no secuencias específicas de la diana previamente ancladas. Opcionalmente, las secuencias diana se proporcionan en el kit desancladas del armazón del nanoinformador.

10 El kit puede incluir también otros reactivos, por ejemplo, tampones para realizar reacciones de hibridación, conectores, endonucleasas de restricción, y ADN ligasas.

El kit también puede incluir instrucciones para el uso de los componentes del kit, y/o para la elaboración y/o el uso de los nanoinformadores marcados.

### 6. EJEMPLO 1: FABRICACIÓN DEL NANOINFORMADOR Y PROTOCOLO

15 El presente es un ejemplo paso por paso de un método de construcción de un nanoinformador a partir de varios componentes.

Se puede apreciar que se pueden construir o añadir varios componentes al mismo tiempo, antes, o después de los otros componentes. Por ejemplo, el recocido de unidades de parches o alas a un armazón se puede realizar simultáneamente o uno después del otro.

20 En este ejemplo la materia de partida es un vector viral M13mp18 circular. Utilizando un M13mp18 de una sola hebra lineal, las unidades de parches se recuecen al mismo para formar un armazón de doble hebra. A continuación, se añaden las alas, después se liga una secuencia específica de la diana. Mientras tanto las etapas de purificación ayudan a separar mediante filtración el exceso de unidades de parches y alas no unidas. También se describe la construcción de ácidos nucleicos marcados (parches y/o alas y/u otros oligonucleótidos marcados) que se unen al nanoinformador.

25 Después del anclaje (p. ej., vía hibridación) de una molécula diana, el nanoinformador se ancla a una superficie y se estira. Finalmente se toman imágenes de los nanoinformadores por medio de una cámara.

Los nanoinformadores se generaron y emplearon con éxito para detectar moléculas diana utilizando los métodos descritos esencialmente en este ejemplo. Un ejemplo de detección de la diana utilizando dicho método se muestra en la Figura 4.

### 30 6.1 CONSTRUCCIÓN DEL ARMAZÓN

La secuencia del armazón de oligonucleótidos seleccionada se analizó utilizando un programa Vector NTI®. En primer lugar, se elaboró un ácido nucleico de hebra sencilla linealizando un ADN de hebra sencilla M13mp18 circular, que fue adquirido comercialmente de New England Biolabs. El M13mp18 circular se digirió con la enzima BamH1 para linealizarlo. Los materiales utilizados consistieron en el vector M13mp18 (250 ng/μl), Parche\_1L\_BamH1.02 (dilución 10 μM de una provisión de partida 100 μM), 10X Tampón BamH1, enzima BamH1. El protocolo para elaborar un total de 0,8 pmoles de M13mp18 lineal implica las siguientes etapas. 1) precalentar un bloque de calentamiento a 37°C; 2) en un tubo ependorff de 0,65 ml combinar 40 μl de vector M13mp18 de 250 ng/μl, 2 μl de Parche\_1L\_BamH1.02 10 μM, y 5 μl de 10X Tampón BamH1; 3) colocar el tubo ependorff en el bloque de calentamiento a 37°C con papel de aluminio en la parte superior. Incubar el tubo a 37°C durante 15 minutos para permitir que la unidad de parche se hibride con el armazón de M13mp18; 4) al cabo de 15 minutos añadir 2 μl de enzima BamH1 y dejar la reacción de digestión a 37°C durante 30 minutos, después de lo cual añadir 2 μl adicionales de enzima BamH1 y dejar que la reacción de digestión continúe durante otros 30 minutos a 37°C (el volumen final de enzima BamH1 es 8%); y 5) tomar alícuotas de 10 μl en tubos ependorff de 0,65 ml y almacenar en un congelador (la concentración final de M13mp18 lineal es 200 ng/μl).

### 45 6.2 PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE PARCHE DE LAS RESERVAS DE PARCHES DE BASES (BPP).

En segundo lugar, las unidades de parche se preparan en reservas. Se seleccionaron las secuencias de oligonucleótidos del parche para determinar la longitud óptima y la homología/no homología deseada con la hebra de M13mp18 y la secuencia genómica humana. Los parches fueron oligonucleótidos manufacturados comercialmente (adquiridos de Integrated DNA technologies) de 60 o 65 bases nucleotídicas de longitud. Las 50 bases nucleotídicas de cada oligonucleótido del parche son complementarias al ADN de hebra sencilla de M13mp18, 10 bases nucleotídicas son complementarias a un parche adyacente, y 5 pares de bases nucleotídicas son complementarias a un ala correspondiente. El emparejamiento de 10 bases nucleotídicas entre parches forma una estructura pedunculada que estabiliza la estructura y ayuda a despegar las alas fuera del armazón cubierto de

manera que estén más disponibles para unir los oligonucleótidos marcados. Los sitios de unión sintéticos, las 5 bases nucleotídicas, sobre los parches para la unión a las alas potencian la energía de un posible sistema modular.

Las reservas de parches de bases contienen nueve unidades de parches correspondientes todas a un agrupamiento de letras y a una posición sobre el nanoinformador específicos. Para este ejemplo, existen cuatro colorantes fluorescentes diferentes (color) marcados A, B, C, y D y 8 posiciones o regiones diferentes donde los ácidos nucleicos marcados se pueden unir sobre un nanoinformador. Por ejemplo, BPP A3 corresponde a todas las unidades A del parche en la posición 3 (unidades de parches 19-27) sobre el nanoinformador.

Las posiciones del nanoinformador son las siguientes:

- Posición 1: Unidades de parches 1-9 (A o C)
- 10 Posición 2: Unidades de parches 10-18 (B o D)
- Posición 3: Unidades de parches 19-27 (A o C)
- Posición 4: Unidades de parches 28-36 (B o D)
- Posición 5: Unidades de parches 37-45 (A o C)
- Posición 6: Unidades de parches 46-54 (B o D)
- 15 Posición 7: Unidades de parches 55-63 (A o C)
- Posición 8: Unidades de parches 64-72 (B o D)

20 Materiales: parches izquierdos y derechos, recocidos previamente entre sí (cada oligonucleótido está a una concentración 10  $\mu$ M). Materiales para elaborar 100 pmoles de BPP 1: (En la posición 1, la coordenada del parche 1L se utiliza para el producto digerido de BamHI -este parche no está incluido en BPP 1): 10  $\mu$ l de cada unidad de parche (coordenadas 2-9) recocida previamente (10  $\mu$ M/cada una), 5  $\mu$ l [20  $\mu$ M] de Parche\_1R (A o C). La concentración final de cada parche es 1,18 pmoles/ $\mu$ l. Materiales para elaborar 100 pmoles de BPP 2-8: 10  $\mu$ l de cada unidad de parche apropiada recocida previamente (10  $\mu$ M/cada una). Existen 9 unidades de parche añadidas a cada uno, o 90  $\mu$ l en total. La concentración final de cada parche es 1,11 pmoles/ $\mu$ l.

25 Más abajo está una tabla de todas las reservas de las unidades de parches elaboradas para este ejemplo, con 8 posiciones o regiones para que los ácidos nucleicos marcados con colorante se unan al nanoinformador. Las posiciones 1, 3, 5, y 7 se pueden unir al ácido nucleico marcado con colorante A o colorante C, y las posiciones 2, 4, 6, y 8 se pueden unir al ácido nucleico marcado con colorante B o colorante D.

Tabla 2 de Reservas de Parches Básicas resultantes (corresponden a las marcas en los tubos)

BPP-A1 [Emparejada Previamente, Color=A, Coordenadas 1-9] Parche_(1-9)R.A Parche_(2-9)L
BPP-B2 [Emparejada Previamente, Color=B, Coordenadas 10-18] Parche_(10-18)R.B Parche (10-18)L
BPP-A3 [Emparejada Previamente, Color=A, Coordenadas 19-27] Parche_(19-27)R.A Parche (19-27)L
BPP-B4 [Emparejada Previamente, Color=B, Coordenadas 28-36] Parche_(28-36)R.B Parche_(28-36)L
BPP-A5 [Emparejada Previamente, Color=A, Coordenadas 37-45]

## ES 2 374 788 T3

<p>Parche_(37-45)R.A Parche (37-45)L</p>
<p>BPP-B6 [Emparejada Previamente, Color=B, Coordenadas 46-54] Parche_(46-54)R.B Parche (46-54)L</p>
<p>BPP-A7 [Emparejada Previamente, Color=A, Coordenadas 55-63] Parche_(55-63)R.A Parche_(55-63)L</p>
<p>BPP-B8 [Emparejada Previamente, Color=B, Coordenadas 64-72] Parche_(64-72)R.B Parche (64-72)L</p>
<p>BPP-C1 [Emparejada Previamente, Color=C, Coordenadas 1-9] Parche_(1-9)R.C Parche (2-9)L</p>
<p>BPP-D2 [Emparejada Previamente, Color=D, Coordenadas 10-18] Parche_(10-18)R.D Parche (10-18)L</p>
<p>BPP-C3 [Emparejada Previamente, Color=C, Coordenadas 19-27] Parche_(19-27)R.C Parche (19-27)L</p>
<p>BPP-D4 [Emparejada Previamente, Color=D, Coordenadas 28-36] Parche_(28-36)R.D Parche (28-36)L</p>
<p>BPP-C5 [Emparejada Previamente, Color=C, Coordenadas 37-45] Parche_(37-45)R.C Parche (37-45)L</p>
<p>BPP-D6 [Emparejada Previamente, Color=D, Coordenadas 46-54] Parche_(46-54)R.D Parche (46-54)L</p>
<p>BPP-C7 [Emparejada Previamente, Color=C, Coordenadas 55-63] Parche_(55-63)R.C Parche (55-63)L</p>
<p>BPP-D8 [Emparejada Previamente, Color=D, Coordenadas 64-72]</p>

Parche_(64-72)R.D Parche_(64-72)L
--------------------------------------

### 6.3 MATERIALES Y PREPARACIÓN PARA RECOCER EL OLIGONUCLEÓTIDO DE HEBRA SENCILLA CON LAS UNIDADES DE PARCHES PARA UN ARMAZÓN DE DOBLE HEBRA.

5 En tercer lugar, las unidades de parche se preparan para recocerlas a M13mp18 lineal de hebra sencilla, cubriendo la hebra con el fin de elaborar un armazón oligonucleotídico de doble hebra. Se necesita que las condiciones para recocer parches de 60 y 65 bases nucleotídicas a M13mp18 se produzcan a altas concentraciones de sal de manera que la unión será muy específica y los parches no se recocerán en una coordenada incorrecta sobre la hebra de M13mp18. Para la etapa de recocido, cada unidad de parche se añade a una razón de 2:1 a 4:1 con la secuencia de M13mp18 de hebra sencilla a un volumen total de 0,5 pmoles. Los parches en exceso se eliminan antes recocer las alas.

10 Los materiales utilizados consistieron en 20x SSC, M13mp18 lineal (digerido con BamH1 a 0,08 pmoles/ $\mu$ l o 200 ng/ $\mu$ l), reservas de parches de bases apropiadas (BPP) (se necesitan un total de 8 a 1,11 pmoles/ $\mu$ l – véase más arriba) y bloque de calentamiento digital ajustado a 45°C. La reacción de recocido se realiza como sigue. Pautas generales: 2X cada unidad de parche por molécula de M13mp18, alas/parches preligados (en la posición 1 u 8) añadidos para su purificación más tarde, y 5X SSC. La reacción del EJEMPLO (0,5 pmoles de armazón con alas con gancho F8) consiste en: 7,1  $\mu$ l hebra M13mp18 digerida con BamH1 a 0,071  $\mu$ M, 0,9  $\mu$ l de cada nueva Reserva de Parches de Bases a 1,11  $\mu$ M para las primeras 7 posiciones: A1, B2, A3, B4, C5, B6 y A7:

1,7  $\mu$ l BPP A1 (Recocido Previamente, 12/15; a 1,18  $\mu$ M/cada parche)

1,8  $\mu$ l BPP B2 (Recocido Previamente, 12/15; a 1,11  $\mu$ M/cada parche)

20 1,8  $\mu$ l BPP A3 (Recocido Previamente, 12/15; a 1,11  $\mu$ M/cada parche)

1,8  $\mu$ l BPP B4 (Recocido Previamente, 12/15; a 1,11  $\mu$ M/cada parche)

1,8  $\mu$ l BPP C5 (Recocido Previamente, 12/15; a 1,11  $\mu$ M/cada parche)

1,8  $\mu$ l BPP B6 (Recocido Previamente, 12/15; a 1,11  $\mu$ M/cada parche)

1,8  $\mu$ l BPP A7 (Recocido Previamente, 12/15; a 1,11  $\mu$ M/cada parche),

25 2,4  $\mu$ l de BPP-D8 (reserva de las siete primeras unidades de parche - coordenadas 64, 65, 66, 67, 68, 69, y 70 en la posición 8 – especificidad "D") con etiquetas de purificación - F8 (FHF, que se recuecen a las coordenadas de parches 71 L, 71R, 72L, 72R, 73L constituyendo unidades completas de alas divididas/parches que tienen especificidad "F" para su uso como conectores de biotina, en la posición F8) a 0,83  $\mu$ M, y 7,3  $\mu$ l de 20X SSC. El volumen de reacción final será de 29,3  $\mu$ l a 0,027 pmoles/ $\mu$ l.

30 También se añade oligonucleótido anti-Bam para recocerlo a la región en M13 que es complementaria a la unidad de parche 1L (perdida) y para prevenir la recircularización del armazón de M13 durante la ligación.

### 6.4 UNIDADES DE PARCHES RECOCIDAS CON M13MP18 DE HEBRA SENCILLA PARA FORMAR ARMAZÓN DE DOBLE HEBRA.

35 La cuarta etapa implica el protocolo para recocer las unidades de parche al M13mp18 lineal de hebra sencilla, cubriendo la hebra con el fin de elaborar un armazón oligonucleotídico de hebra sencilla, se realiza en las siguientes etapas: 1) precalentar el bloque de calentamiento a 42°C, calentar la solución de reacción anterior a 45°C en uno o varios tubos de PCR pequeños (o tiras) con papel de aluminio sobre la parte superior durante 15 minutos, cambiar el bloque de calentamiento a 65°C e incubar durante 1 hora y 45 minutos adicionales y retirar los tubos, colocar sobre hielo o congelar.

### 40 6.5 PURIFICACIÓN DEL ARMAZÓN DE NANOINFORMADOR UTILIZANDO BIOTINA Y CUENTAS MAGNÉTICAS CON ESTREPTAVIDINA.

45 La quinta etapa ocurre antes del anclaje de las alas, donde las unidades de parche en exceso que no se han recocido a la hebra de M13mp18 se separan del armazón oligonucleotídico de doble hebra. Una etiqueta de purificación con una región homóloga de 5 bases oligonucleotídicas a algunas de las 5 bases oligonucleotídicas complementarias de las unidades de parche protuberantes se recuece para 'enganchar' el armazón. Los oligonucleótidos biotinilados se recuecen con la 'etiqueta de purificación' y se utilizan cuentas magnéticas con estreptavidina para capturar el armazón utilizando los oligonucleótidos biotinilados. Las unidades de parche en



exceso se eliminan con el sobrenadante. El armazón se separa por fusión de las cuentas magnéticas en solución para su recuperación.

### 6.6 RECOCIDO DE LOS CAPTADORES DE D-BIOTINA CON LAS ETIQUETAS DE PURIFICACIÓN

5 Recocer los captadores de D-Biotina a las etiquetas de purificación sobre el nanoinformador (haciendo 2X con respecto a la cantidad de posiciones de alas D8 disponibles en solución, que es 2X con respecto a M13, o 4X final): 0,5 pmoles X 25 posiciones de oligonucleótidos gancho (5 multiplicado por 5), 4X hace que 50 pmoles se traduzcan a 0,50 µl de D-biotina de 100 pmoles/µl, añadir 0,5 µl (D, E, F) - Biotina (a 100 µM) a la muestra, mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

### 10 6.7 PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN PARA SEPARAR MEDIANTE LAVADO LAS UNIDADES DE PARCHE NO UNIDAS DEL ARMAZÓN DE DOBLE HEBRA.

Recocer los oligonucleótidos gancho F en un exceso de 25 veces a los nanoinformadores en 5X SSC durante 30 min a temperatura ambiente. Pipetear 200 µl de solución de cuentas DynaBead MyOne Streptavidin® en tubos de 1,5 ml, colocar sobre un imán y eliminar el sobrenadante. Lavar dos veces con 5X SSC resuspendiendo y aclarando con un imán como en la etapa anterior. Añadir 80 µl de muestra en 5X SSC (80 fmoles de muestra en este ejemplo).  
 15 Resuspender bien, por medio de colocación en un vórtice durante 15 minutos. Aclarar la solución con un imán y transferir el sobrenadante a tubos de nueva aportación para el último análisis en gel. Mientras se encuentran sobre el imán, lavar los sedimentos (no resuspender) con 80 µl de TE pipeteando sobre el sedimento tres veces con el volumen de 80 µl original añadido. Retirar el lavado, colocar en tubos de "lavado" de nueva aportación para su análisis. Calentar el tampón TE a 45°C, añadir 80 µl a cada sedimento y resuspender. Colocar los tubos sobre el  
 20 bloque de calentamiento a 45°C durante 15 minutos, pipetear arriba y abajo una vez para asegurarse de que las cuentas permanecen suspendidas. Aclarar el producto inmediatamente con un imán mientras se calienta y guardar. La mayoría de los nanoinformadores purificados deben estar presentes en este producto eluido a 45°C.

### 6.8 RECOCIDO Y LIGACIÓN DE LAS ALAS AL ARMAZÓN.

25 La sexta etapa implica dividir los oligonucleótidos del ala que se recuecen al armazón para elaborar un 'armazón cubierto'. La purificación con cuentas magnéticas se realiza después de eso para eliminar el exceso de alas divididas. La ligación del armazón cubierto se realiza utilizando ligasa de T4 para aumentar la estabilidad de la estructura. Solo se necesita un tipo de ala por colorante fluorescente. Las alas tienen o 95 o 100 bases de longitud y tienen regiones complementarias a los parches, a los oligonucleótidos marcados y entre sí. Cada ala tiene secuencias repetidas de 15 bases para unirse a los oligonucleótidos marcados. Las secuencias repetidas están  
 30 basadas en secuencias Lambda que han sido analizadas para eliminar palíndromos y estructuras en horquilla cualesquiera.

Las condiciones para recocer las alas son las siguientes. La secuencia de las alas que corresponde al parche tiene 5 pares de bases oligonucleotídicas de longitud, y por lo tanto las alas se recuecen específicamente a los parches incluso a altas concentraciones de sal. La razón de las alas a los parches es de 2:1. Con el fin de aumentar la  
 35 estabilidad a altas temperaturas, la ligación de los parches entre sí y del ala a los parches se puede llevar a cabo en la misma reacción.

1) Cuantificar el armazón purificado utilizando un espectrómetro a A260 nm. Calcular el volumen necesario para preparar una cantidad apropiada de nanoinformador. Para este ejemplo los autores de la presente invención utilizaron 110 ng o 0,023 pmoles, la lectura a A260 nm muestra 7,7 ng/µl, o 14,3 µl para 110 ng. 2) Establecer la  
 40 reacción de ligación como sigue (el volumen variará, dependiendo de la purificación y la escala). Utilizar comúnmente 1,5X alas con respecto a los parches, calcular como corresponde. Para este ejemplo, existen cuatro colorantes fluorescentes diferentes (color) marcados como A, B, C, y D y 8 posiciones o regiones diferentes donde los ácidos nucleicos marcados con colorante se pueden unir sobre un nanoinformador. El número de posiciones para cada color (en este caso 1-4) multiplicado por 9 multiplicado por 1,5 moles de armazón = moles de alas a  
 45 utilizar.

Para el nanoinformador con colorante fluorescente en la secuencia/posiciones [ABABCBAD] :

ABABCBAD =

A:  $40,5 \times 0,023 = 0,93$  pmoles; vol: 0,93 µl de SF (ala dividida)-AL a 1 µM

0,93 µl de SF-AR a 1 µM

50 B:  $40,5 \times 0,023 = 0,93$  pmoles; vol: 0,93 µl de SF-BL a 1 µM

0,93 µl de SF-BR a 1 µM

C:  $13,5 \times 0,023 = 0,31$  pmoles; vol: 0,31 µl de SF-CL a 1 µM

0,31 µl de SF-CR a 1 µM

C:  $13,5 \times 0,023 = 0,31$  pmoles; vol: 0,31  $\mu\text{l}$  de SF-DL a 1  $\mu\text{M}$

0,31  $\mu\text{l}$  de SF-DR a 1  $\mu\text{M}$

5 La reacción de ligación (total 25  $\mu\text{l}$ ) consiste en: Alas Divididas (véase más arriba; 4,96  $\mu\text{l}$ , o  $\sim 5$   $\mu\text{l}$  en total), 14,3  $\mu\text{l}$  de armazón MODB a 0,0016 pmoles/ $\mu\text{l}$ , 2,5  $\mu\text{l}$  de 10X Tampón de ligación de T4, 2,2  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O NanoPure y 1  $\mu\text{l}$  ligasa de T4. Incubar los tubos durante 5 minutos a 45°C. Mover a un baño de agua a 37°C, inc. durante 5 minutos. Añadir 1  $\mu\text{l}$  de ligasa de T4 a las muestras. Incubar durante 1 hora a 37°C. Congelar inmediatamente, o calentar a 75°C durante 5 minutos para destruir la ligasa de T4.

### 6.9 LIGACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE LA DIANA A LOS NANOINFORMADORES

10 La séptima etapa implica la ligación de una secuencia específica de la diana al nanoinformador. Se diseña una secuencia de ADN específica de la diana para que sea complementaria a la molécula diana, que puede ser ARN (*p. ej.*, ARNm) o ADN (*p. ej.*, ADNc o ADN genómico). La secuencia específica de la diana puede ser de 35, 60 o 70 bases nucleotídicas de longitud. La secuencia específica de la diana se puede ligar al armazón utilizando una región protuberante de hebra sencilla sobre el armazón cubierto. El armazón con un solo tipo de secuencia específica de la diana se puede elaborar separadamente y a continuación mezclar para formar genotecas.

### 15 6.10 CONSTRUCCIÓN DEL NANOINFORMADOR

La adición de oligonucleótidos a un nanoinformador se puede realizar en cualquier momento durante la construcción de un nanoinformador. En ciertos aspectos de la presente invención, un oligonucleótido marcado tiene 15 bases nucleotídicas de longitud. En el extremo 5', se ancla un solo colorante fluoróforo. Los oligonucleótidos con un colorante fluoróforo particular tendrán por lo general la misma secuencia. Estos oligonucleótidos marcados se unen a las secuencias repetidas de las alas divididas. Los fluoróforos mejor adaptados a este ejemplo incluyen pero no están limitados a Alexa 488, cy3, Alexa 594, y Alexa 647. La longitud de 15 bases oligonucleotídicas mantiene los fluoróforos lo suficientemente separados con el fin de que no se extingan entre sí y aseguren que los ácidos nucleicos marcados serán estables (no se fundirá la hebra complementaria) en las condiciones del procedimiento de visualización. Los oligonucleótidos marcados son estables a 40°C. Esta corta longitud también posibilita el empaquetamiento de un gran número de colorantes fluorescentes sobre las alas. En ciertos aspectos de la invención, los oligonucleótidos marcados se introducen durante el procesamiento de la muestra diana.

### 6.11 ANCLAJE DE LOS NANOINFORMADORES A LAS MOLÉCULAS DIANA

30 Los nanoinformadores se pueden anclar a las moléculas diana utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. En una realización ilustrativa, los nanoinformadores duales se hibridan a las moléculas diana mezclando 250 pmoles de cada una de la primera sonda y la segunda sonda con 125 pmoles de la diana. El volumen total se ajusta a 4  $\mu\text{l}$  y a una concentración final de tampón de 5X SSC. Esta mezcla se incuba en un tubo de PCR cubierto durante la noche a 42 grados para permitir que se produzca la hibridación.

### 6.12 ANCLAJE A LA SUPERFICIE

35 Una vez que los nanoinformadores se anclan tanto a la molécula diana como a los ácidos nucleicos marcados correspondientes, es decir, los ácidos nucleicos anclados a los monómeros marcadores, estos se pueden anclar a una superficie y extenderse al resolver el orden de las señales emitidas por los monómeros marcadores e identificar de este modo la molécula diana. En este ejemplo, los nanoinformadores se estiran para resolver espacialmente sus códigos de colorantes fluorescentes que corresponden a una molécula diana concreta. Los nanoinformadores se estiran anclando un extremo a una superficie (en este ejemplo – un cubreobjetos, véanse a las preparaciones de más abajo). Se pueden utilizar dos métodos para el anclaje a la superficie: A) portaobjetos recubiertos de estreptavidina de Accelr8 Corporación estando los nanoinformadores biotinilados y B) portaobjetos recubiertos de biotina teniendo los nanoinformadores estreptavidina. En el tampón, los nanoinformadores se ponen en contacto con la superficie activa y se dejan incubando durante un período de tiempo. La reacción se realiza en células de flujo que fueron elaboradas a partir de PDMS moldeado en láminas de silicio grabadas al aguafuerte para formar los canales. 45 Se utilizan tubos de metal para los pocillos centrales en los extremos de los canales para la inserción del tampón y de la muestra. Las dimensiones de los canales son 0,5 mm o 1 mm de ancho y 54  $\mu\text{m}$  de alto. Una vez que las muestras se han cargado en la línea de células de flujo e incubado, se deben anclar los nanoinformadores. Los nanoinformadores se pueden extender aplicando voltaje o eliminando el líquido con un menisco en retracción dejando las cadenas estiradas y secas.

### 50 6.13 PREPARACIÓN DE LA SUPERFICIE Y ENSAMBLAJE DEL DISPOSITIVO

Las superficies de unión (tipo Accclr8 Streptavidin-OptiChem, cubreobjetos recubiertos) se envían en unidades de 5 superficies por contenedor de portaobjetos, y cada contenedor se acompaña de un paquete de desecante de sílice en una bolsa de papel de aluminio. Las bolsas se almacenan a -20°C hasta su uso.

55 Para preparar la superficie para la unión, se saca primero una bolsa del congelador y se deja que llegue a la temperatura ambiente a lo largo de varios minutos. Si no se abrió previamente, la bolsa se corta a continuación a lo

largo del borde para formar una hendidura, y se retira el contenedor superficies. Después de la retirada de la superficie requerida, el contenedor se vuelve a poner en la bolsa con su desecante, la hendidura se cierra sellada con una tira de cinta de empaquetar, y la bolsa se vuelve a poner en el congelador.

- 5 La superficie se enjuaga ligeramente a continuación con una corriente de agua Nanopure (Barnstead Nanopure Diamond) y se empapa durante 10 minutos en 1X PBS filtrada a 0,2  $\mu\text{m}$  en una jarra Coplin ranurada, limpia. Después de empaparse, la superficie se sumerge en agua Nanopure y se seca soplando nitrógeno filtrado a través del borde de la superficie.

- 10 El dispositivo de PDMS utilizado para el acoplamiento a la superficie y para proporcionar la localización de la muestra se limpia inmediatamente antes de su uso aplicando cinta de celofán a la superficie de PDMS y a continuación quitando el polvo u otras partículas que se puedan haber pegado durante el almacenamiento. El sitio de unión de la superficie Accelr8 se pone boca arriba, y la estructura de PDMS limpia se centra, con el canal boca abajo, sobre la superficie. El PDMS se adhiere fácilmente al vidrio recubierto, y no es necesario ningún mecanismo de anclaje adicional.

#### 6.14 UNIÓN DE LA MUESTRA Y LAVADO

- 15 La muestra se une a la superficie aplicando primero una gota de 5  $\mu\text{L}$  de la muestra (diluida comúnmente en tampón de borato de sodio 100 mM, pH 9,8) en un pocillo de la calle elegida. La gota debe tocar justamente el punto en el que el canal se une al pocillo (alguna muestra se puede escurrir al canal en este punto). El canal se carga, y la unión se iguala a través del canal, arrastrando la gotita a través del canal hacia el pocillo opuesto utilizando un vacío muy débil ( $< 2$  kPa). El procedimiento se repite para las otras muestras en sus calles respectivas. El líquido en exceso se separa a continuación de los pocillos, los pocillos se tapan con cinta adhesiva para reducir la evaporación, y el dispositivo se incuba a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos.

- 20 Después de la unión, se retira la cinta adhesiva, y el pocillo de la parte superior de cada calle se carga con 100  $\mu\text{L}$  del tampón de borato descrito anteriormente. Alrededor de 20  $\mu\text{L}$  de ese tampón se arrastran a través de los canales hacia los otros pocillos utilizando el vacío, y el procedimiento se repite una vez. A continuación se elimina todo el tampón de borato de todos los pocillos, y el pocillo de la parte superior se carga con 1X TAE, pH 8,3. Alrededor de 50  $\mu\text{L}$  de TAE se arrastran a través del canal, a continuación se elimina todo el TAE y el pocillo se vuelve a cargar. El procedimiento se repite tres veces, para un total de alrededor de 150  $\mu\text{L}$  de enjuague con TAE. Finalmente, todos los pocillos se cargan con 100  $\mu\text{L}$  de 1X TAE.

#### 6.15 ELECTROESTIRAMIENTO

- 30 Se aplica aceite de inmersión en la parte inferior del dispositivo del cubreobjetos/PDMS y se coloca sobre el microscopio. Se insertan electrodos en los pocillos en extremos opuestos del primer canal de PDMS (electrodo negativo en el pocillo de la parte superior, positivo en la parte inferior). La primera imagen del canal se tomará cerca del pocillo de la parte inferior; la plataforma del microscopio se ajusta de manera que el área de interés esté enfocada.

- 35 Después se aplica voltaje (200 V) a través del canal. El voltaje se suministra por medio de una fuente de alimentación de corriente continua (Agilent E3630A) y se amplifica 100X a través de un amplificador casero. Después de aplicar la corriente, se reajusta el foco, y comienza el procedimiento de formación de imágenes.

Después se repite el procedimiento de electroestiramiento y formación de imágenes con el resto de los canales. Se forman las imágenes de las uniones.

#### 40 6.16 FUENTE DE LUZ PARA LOS COLORANTES FLUORESCENTES SOBRE EL NANOINFORMADOR

Al utilizar una lámpara de arco como fuente de luz, la mejor selección de fluoróforo es la de los tipos más brillantes sin que conduzca al solapamiento de la fluorescencia tales como Alexa 488, Cy3, y Alexa 594. También se pueden utilizar colorantes fluorescentes más débiles tales como Alexa 647 y Cy5.5.

#### 45 6.17 FILTROS PARA FORMAR IMÁGENES DE LOS COLORANTES FLUORESCENTES SOBRE EL NANOINFORMADOR

Para los fluoróforos seleccionados Alexa 488, Cy3, Alexa 594 y Alexa 647 puede haber un solapamiento entre Cy3 y Alexa 594. Sin embargo, el encargo a la medida de un filtro de emisión con un ancho de banda de 572-600 nm minimiza el solapamiento.

#### 6.18 MICROSCOPIO Y LENTES DEL OBJETIVO PARA FORMAR LA IMÁGEN DE LOS NANOINFORMADORES

- 50 El modelo de microscopio utilizado fue Nikon Eclipse TE2000E de Nikon Incorporation utilizando la plataforma invertida para la formación de imágenes por fluorescencia que tiene 6 casetes de filtros que permiten la selección de la emisión de fluorescencia a partir de múltiples candidatos de colorantes fluorescentes. Para los colorantes seleccionados, la resolución óptica requerida es de alrededor de 400 nm para todas las longitudes de onda (500-700

nm). La lente objetivo seleccionada es la lente Nikon Plan Apo TIRF que tiene una AN de 1,45 y un aumento de 60. La resolución óptica es de ~210-300 nm para diferentes longitudes de onda.

**7. EJEMPLO 2: PROTOCOLO DE FABRICACIÓN DEL NANOINFORMADOR DE PARCHÉ/ALA**

5 Este ejemplo demuestra otra manera para elaborar un nanoinformador que consiste en un ADN viral de M13mp18 lineal de hebra sencilla, unidades de parches de oligonucleótidos y alas largas.

Las unidades de marcaje de nanoinformadores se generaron satisfactoriamente utilizando los métodos descritos esencialmente en este ejemplo.

10 Las unidades de parches y alas prefosforiladas se añaden junto con el vector de ADN de M13mp18 y se ligan entre sí. Después de la ligación de las alas a las unidades de parches que se ligan al ADN de M13mp18, se introduce la enzima BamH1 para linealizar el vector.

Preparar un lote de nanoinformadores partiendo de 5 µg de M13mp18 como armazón. La hibridación se puede aumentar a escala de acuerdo con la cantidad deseada. Este procedimiento tardará alrededor de 1-2 días en completarse.

Materiales:

Cant.	Artículo	Vendedor
20	250 µg/µl de ADNhs viral M13mp18	New England Biolabs
27 µl	0,74 pmoles/µl de Mezcla de Unidades de Parche de Oligonucleótidos	IDT
8 µl	Oligonucleótido A de Ala Larga 100 pmoles/µl	IDT
8 µl	Oligonucleótido B de Ala Larga 100 pmoles/µl	IDT
0,5 µl	Oligos Ala parche a 100 pmoles/µl de las placas Núm. 529916 y Núm. 610591	IDT
31 µl	10x tampón Ligasa de T4	Fermentas
19 µl	Ligasa de T4	Fermentas
15 µl	10x tampón Optikinase	USB
4,2 µl	ATP 100 mM	ANY
5 µl	Enzima Optikinase 10 unidades/µl	USB
1 µl	oligonucleótido BamH1 10 pmoles/µl	IDT
20 µl	10x tampón BamH1	Fermentas
3 µl	Enzima BamH1 10 unidades/µl	Fermentas

15  
20 Precalentar un baño de agua a 37°C y 55°C antes de comenzar el protocolo. Asegurarse de que los tampones estaban todos bien mezclados y descongelados antes de su uso. Una placa de trabajo debe estar disponible y marcada con los oligos ordenados de IDT en las placas Núm. 529916 y Núm. 610591. Retirar esas dos placas y descongelar a temperatura ambiente durante 0,5-1 horas y girar hacia abajo los contenidos antes de retirar la cinta adhesiva que cubre los pocillos. Se establecerán cuatro reacciones separadas en tubos eppendorf de 1,5 mL utilizando los oligonucleótidos específicos de estas placas. Para comenzar marcar estos cuatro tubos separados con números romanos en sus tapas. Las Columnas 5 y 6 A a H son para la reacción I, las Columnas 7 y 8 A a H son

## ES 2 374 788 T3

para la reacción ii todas se encuentran en la placa Núm. 529916. Las Columnas 1 y 2 son para la reacción iv, y las Columnas 3 y 4 son para la reacción iii.

- 5 Ligaciones de las Alas (Etapa A): Marcar cuatro tubos de 1,5 ml separados con números romanos i a iv (mencionado anteriormente). Añadir los reactivos de más abajo como corresponde a cada reacción 50 µl que contiene: 5 µl de 10x tampón de ligasa, 0,5 µl/oligonucleótido de los pocillos designados de las placas Núm. 529916 y Núm. 610591, 4 µl de Oligo de Ala Larga/reacción (A o B) para las reacciones I, ii y iv. 3 µl de LF para el área iii, 29 H<sub>2</sub>O para las reacciones I, ii y iv. 32 µl de H<sub>2</sub>O para la reacción iii, y 4 µl de ligasa de T4. Recocer previamente los oligos en esta mezcla sin la ligasa a 37°C durante media hora. Añadir ligasa como último reactivo y permitir ligar a temperatura ambiente durante al menos cuatro horas. La concentración de producto es de 1 pmoles/ala/µl.
- 10 Fosforilación en la Ligación de las Alas (Etapa B) Marcar cuatro tubos de 1,5 ml separados con números romanos de nuevo, de uno a cuatro con una P en el interior de un círculo para designar que los productos están fosforilados. Añadir los siguientes reactivos al tubo correspondiente: 10 µl/reacción de ligación de Ala (recoger 10 µl/ reacción de ligación de ala anterior), 2,5 µl de tampón Optikinase, 0,5 µl de ATP 100 mM, 11,5 µl de H<sub>2</sub>O, y 0,5 µl de enzima Optikinase. Incubar a 37°C durante 1 hora. Concentración de producto 0,4 pmoles/ala/µl.
- 15 Fosforilación de la Unidad de Parche de Oligonucleótidos (Etapa C) 27 µl de mezcla de la Unidad de Parche de Oligonucleótidos 0,74 pmoles/µl, 5 µl de 10x tampón, 1 µl de ATP 100 mM, 3 µl de Enzima Optikinase, y 14 µl de H<sub>2</sub>O. Una vez que están juntos todos los reactivos mezclar suavemente la solución sacudiendo el tubo unas pocas veces y girar hacia abajo. Incubar a 37°C durante 1 hora.
- 20 Hibridación al armazón de M13mp18 (Etapa D) En un nuevo tubo de 1,5 ml añadir los siguientes reactivos: 20 µl de M13mp18 a 250 ng/µl, 27 µl de Unidades de Parches de Oligonucleótidos Fosforilados de 0,4 pmoles/µl (Etapa C), 12,5 µl/Ligación de las Alas Fosf. (Etapa B) precalentar a 55°C durante 5 minutos y colocar sobre hielo, 11 µl de 10x tampón de ligasa y calentar la mezcla completa a 55°C durante 1 minuto. Hibridar la mezcla a 37°C durante al menos 4 horas.
- 25 Ligación (Etapa E) Girar hacia abajo los contenidos del tubo eppendorf. Añadir 1,2 µl de ATP 100 mM y 3 µl de ligasa de T4. Mezclar suavemente los contenidos sacudiendo el tubo, a continuación girar hacia abajo.
- Digestión con BamH1 (Etapa F): 1 µl de oligo BamH1 de 10 pmoles, 20 µl de 10x tampón BamH1 e hibridar a 37 ~1 hora. Ajustar el volumen a 200 µl. Añadir 3 µl de enzima BamH1. Incubar a 37°C durante 1 hora.
- 30 Primera etapa: comenzar añadiendo 20 µl de M13mp18 (NEB 250 µg/ml) a un tubo eppendorf limpio de 1,7 ml. Recoger 5 µl de la reacción de ligación de Alas Fosforiladas y precalentarla a 70 durante 2 minutos e inmediatamente colocar sobre hielo. Añadir los 5 µl de cada reacción de Ligación de Alas Fosforiladas (1 pmoles/ala/µl) al tubo y mezclar suavemente pipeteando unas pocas veces. Incubar el tubo eppendorf a 37°C durante 1 hora.
- 35 Segunda etapa: colocar 13,5 µl de la Mezcla de Unidades de Parches de Oligonucleótidos (0,74 pmoles/µl) y 1 µl de Acrydite Mix (10 pmoles/µl) en un tubo eppendorf de 1,7 ml nuevo. Añadir 5 µl de 10x tampón Optikinase, 1 µl de ATP 100 mM y 27,5 µl de H<sub>2</sub>O. Mezclar suavemente pipeteando la solución. Añadir 2 µl de Enzima Optikinase, mezclar suavemente pipeteando e Incubar a 37°C durante 1 hr.
- Tercera etapa: recoger los oligos rxn fosforilados y añadirlos completamente al contenido de M13mp18+ Hibridación de Alas. La reacción se mezcla suavemente pipeteando y se deja incubando a 30°C durante 1 hora. Después de completar la hibridación ajustar el ATP añadiendo 1 µl (100 ATP) a la reacción.
- 40 Cuarta etapa: girar hacia abajo el contenido del tubo eppendorf y añadir 4 µl de enzima Ligasa de T4 (5 unidades/µl), mezclar suavemente pipeteando. Incubar a temperatura ambiente durante al menos cuatro horas. Añadir 1 µl de oligonucleótido BamH1 (10 pmoles/µl) para hibridar a temperatura ambiente mientras tiene lugar la ligación.
- 45 Quinta etapa: digerir la reacción de ligación añadiendo 4 µl de enzima BamH1 (5 unidades/µl), mezclar suavemente pipeteando e incubar a 37°C durante 1 hora. Una vez que finaliza el período de incubación, recoger una alícuota de 500 ng para QC.
- Sexta etapa: tratar con Psoraleno, luz UV o DMPA durante 15 minutos.
- Los cálculos incluyen:
- 5 µg de M13 = 20 µl de provisión de partida de New England Biolabs = 2 pmoles
- Mezcla de oligonucleótidos: 180-34 áreas de ala – 10 Oligos modificados con Acrydite = 0,74 pmoles/oligo
- 50 10 pmoles/oligonucleótido = 13,5 µl = 1350 pmoles
- 1 unidad de Optikinase convierte 1 nmol de fosfato en extremos – utilizar en exceso. Se utilizaron 4 µl de Optikinase.

SEQ ID NO: 1 = M13mp18.

## 8. EJEMPLO 3: PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOINFORMADORES DE ARN

5 Se generaron nanoinformadores y se emplearon satisfactoriamente para detectar moléculas diana utilizando métodos esencialmente como se describe en este ejemplo. Un ejemplo de detección de la diana utilizando este método se muestra en la Figura 6.

### 8.1 PRODUCCIÓN DEL ARMAZÓN

10 El ADN circular de M13mp18 de hebra sencilla (USB Corporation) se recuece hasta un exceso molar de 10 veces de un oligonucleótido complementario al sitio de reconocimiento de Bam HI (oligo Cortador Bam) y se corta con la enzima de restricción Bam HI para producir una cadena principal de ADN de hebra sencilla lineal. Con posterioridad se añade un oligonucleótido complementario al oligonucleótido Cortador Bam (anti-oligonucleótido Bam) en un exceso de 50 veces al oligonucleótido Cortador de Bam para secuestrar el oligonucleótido Cortador de Bam libre y evitar de este modo la recircularización de M13 durante las últimas etapas.

La molécula de M13 lineal sirve como un armazón sobre el que se pueden recoger parches de ARN, o segmentos de ARN, con fluoróforos incorporados.

### 15 8.2 PCR PARA FORMAR POSICIONES DE DOBLE HEBRA SOBRE EL ARMAZÓN DE M13

20 Se diseñaron 10 juegos de pares de cebadores oligonucleotídicos para crear 10 regiones diferentes junto con el armazón de M13. Cada par contiene un cebador que tiene un promotor de la ARN polimerasa de T7 en el extremo 5'. Las Regiones 2-7 se diseñan para que tengan 900 bases (aproximadamente 300 nm) de longitud, puesto que éste es el tamaño aproximado de una mancha de difracción limitada (la mancha más pequeña que se puede lograr con una óptica convencional). Las Regiones 1 y 8 tienen ambas versiones largas y cortas: las versiones largas cubren la región de 900 bases completa, mientras que las versiones cortas cubren solo una porción de la región de 900 bases para permitir que sea ligada una secuencia específica de la diana. De este modo se puede adjuntar a cualquier extremo una secuencia específica de la diana. Los extremos también se pueden utilizar para adjuntar anclas o etiquetas.

25 La PCR se realiza utilizando polimerasa Taq y 0,5 ng de M13mp18 de doble hebra (USB Corporation) como molde. Las reacciones se limpian utilizando un kit de purificación Qiaquick de Qiagen. Cada reacción PCR produce un fragmento de doble hebra que corresponde a un segmento específico como se ilustra más abajo. Estos fragmentos se utilizan como moldes para la transcripción *in vitro* de los segmentos de ARN.

### 8.3 TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* PARA PRODUCIR SEGMENTOS DE ARN OSCURO

30 Utilizando los productos de la PCR descritos anteriormente como moldes de doble hebra, se generan segmentos de ARN utilizando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion (kit Megascript T7). Los productos de las reacciones de transcripción se purifican (incluyendo el tratamiento con ADNasa I para eliminar el molde) utilizando RNeasy Kit de Qiagen.

### 35 8.4 TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* PARA PRODUCIR SEGMENTOS DE ARN MODIFICADOS CON GRUPOS AMINOALILO

40 Utilizando los productos de la PCR descritos anteriormente como moldes de doble hebra, se generan segmentos de ARN para el posterior acoplamiento del colorante utilizando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion (kit MessageAmp aRNA). Los nucleótidos de UTP modificados con aminoalilo se incorporan a los segmentos de ARN durante la transcripción. Los productos de las reacciones de transcripción se purifican (incluyendo el tratamiento con ADNasa I para eliminar el molde) utilizando RNeasy Kit de Qiagen.

### 8.5 ACOPLAMIENTO AL COLORANTE DE LOS SEGMENTOS DE ARN CON AMINOALILO PARA PRODUCIR SEGMENTOS DE ARN COLOREADOS

45 Se acoplan 20-100 µg de segmentos de ARN modificado con aminoalilo a colorantes de éster de NHS utilizando Ambion Aminoallyl Labeling Kit. Los colorantes incluyen Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647 (Invitrogen/Molecular Probes) así como Cy3 (Amersham).

Cada segmento se elabora separadamente en 4 colores de manera que cada posición sobre el armazón se pueda rellenar con un segmento en cualquiera de los cuatro colores; de este modo se pueden añadir diferentes colores a diferentes posiciones para crear muchas combinaciones de colores únicas.

50 En esta realización concreta, los segmentos adyacentes deben ser de diferentes colores o puede haber segmentos oscuros intercalados de manera que cada segmento se detecta como una "mancha" individual. Se pueden utilizar segmentos oscuros como parte del código del nanoinformador.

## 8.6 ENSAMBLAJE DE LA MOLÉCULA MARCADORA

Se recuecen segmentos para cada posición a una razón 2:1 de segmento con respecto al armazón de M13 en 1X tampón SSPE a 70°C durante 2 horas.

5 Un nanoinformador ensamblado con segmentos de ARN marcados se representa en la Figura 3A-3B. La Figura 3A representa un nanoinformador en el que solo están marcadas "manchas" alternas (1, 3, 5 y 7), y la Figura 3B representa un nanoinformador en el que cada mancha está marcada.

## 9. EJEMPLO 4: DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE ARN Y ADN DIANA (S2) QUE UTILIZAN UNA COMBINACIÓN DE NANOINFORMADOR DE ARN/SONDA FANTASMA

### 9.1 SÍNTESIS DE LA SONDA Y DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DIANA

10 El oligonucleótido diana de ADN S2 se sintetizó y purificó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (Integrated DNA Technologies). Las moléculas diana de ARN S2 se generaron por medio de transcripción *in vitro* de productos de PCR correspondientes a la región del gen del SARS de coronavirus clonado (Invitrogen) utilizando un kit Ambion Megascríp® siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda fantasma S2 (Figura 6A (i)) fue complementaria a una región de 50 bases específica de la secuencia diana S2 (S2-a) y se sintetizó con un  
15 monómero de TEG-biotina en el extremo 5' y se purificó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (Integrated DNA Technologies). Se sintetizó un segundo oligonucleótido con 50 pb complementario a la diana S2 (S2-b) más 9 pb de una secuencia adicional utilizada para la ligación al armazón de M13 (total 59 pb) y se purificó por medio de HPLC (Integrated DNA Technologies). Obsérvese que las regiones diana S2-a y S2-b no fueron solapantes.

### 9.2 SÍNTESIS DEL NANOINFORMADOR

20 El oligonucleótido S2-b se ligó al extremo 5' de M13 linealizado [Figura 6A (iii)], y el producto resultante se separó mediante purificación del oligonucleótido no ligado residual por medio de filtración de exclusión por tamaños a través de un filtro YM100 (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generaron segmentos de ARN modificados con amino-alilo complementarios a M13 en las posiciones 2, 4, 6, y 8 (SEQ ID NO:) (Figura 1C) a partir  
25 de transcripción *in vitro* de moldes de ADN (productos de PCR) a través del kit Ambion Megascríp® siguiendo las instrucciones del fabricante. Los segmentos se acoplaron a continuación a colorante Alexa 647 modificado con éster de NHS (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de Ambion (Amino Alkyl MessageAm® II aRNA Kit). Se generaron segmentos de ARN correspondientes a las posiciones 1, 3, 5, y 7 del armazón de M13 (Figura 1C) en forma de ARN transcritos *in vitro* no modificados a partir de los moldes de ADN descritos anteriormente. El ensamblaje del nanoinformador se llevó a cabo recociendo 10 fmoles/μl de cada uno de los ocho segmentos a 5 fmoles/μl del  
30 armazón de M13-S1-b durante 2 horas a 70°C en 1X tampón SSPE (cloruro de sodio 150 mM, fosfato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM). El producto final fue un nanoinformador con 4 segmentos marcados con A647 (rojo) intercalados con segmentos oscuros.

### 9.3 CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN

35 La hibridación de los nanoinformadores y las sondas fantasma a la diana se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 5X SSPE (cloruro de sodio 750 mM, fosfato de sodio 50 mM, sal disódica de EDTA 5 mM), sonda fantasma 40 pM (oligonucleótido de anclaje S2-a), Nanoinformador S2-b 40 pM, 100 ng/μl de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, 5X solución de Denhardt y Tween al 0,1%. Las condiciones finales de la diana fueron diana de ADN S2 20 pM (Figura 6B) y diana de ADN S2 1pM (Figura 6C). No se añadió diana al control negativo  
40 (Figura 6D). La reacción de hibridación se incubó a 65°C durante al menos 16 h.

Las reacciones de hibridación se diluyeron 1:2 con solución de tampón de Borato 100 mM (pH 9,8) y se introdujeron en un canal de células de flujo y se unieron a un cubreobjetos recubierto con estreptavidina formando la parte inferior del canal (cubreobjetos Streptavidin-OptiChem de Accelr8). El anclaje al portaobjetos mediante un extremo del complejo de nanoinformador/diana/sonda fantasma se logró a través de la interacción de la sonda fantasma biotinilada con la superficie de estreptavidina. Después de enjuagar el canal con tampón de borato adicional para  
45 eliminar los informadores en exceso no unidos a la superficie, el tampón se cambió por 1X TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y se aplicó una corriente de 200 V para estirar los complejos de nanoinformador/diana durante la captura de la imagen.

50 Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Leica DMI 6000B con un objetivo de inmersión de aceite 63X (AN 1,4), fuente de luz Xcite-120 (Exfo), juegos de filtro a la medida (Chroma Technologies), una cámara Orca-ER CCD (Hamamatsu) y programas de adquisición de datos Metamorph (Molecular Devices).

Según se pronosticó, cuando hibrida la molécula diana S2 correcta [Figura 6A (ii)] tanto con la sonda fantasma [Figura 6A (i), S2-a] como con el nanoinformador específico de la diana S2-b [Figura 6A (iii)], el complejo de sonda fantasma/diana/nanoinformador forma una sola especie que se ancla al portaobjetos y se visualiza como 4 manchas  
55 cuando se expone a luz de longitud de onda de 647 nm (Figura 6B, 6C, y 6E). La cantidad de unión fue dependiente de la concentración de la diana. No hubo una unión significativa en ausencia de la secuencia diana S2 (Figura 6D).

**10.EJEMPLO 5: NANOINFORMADOR QUE COMPRENDE UN FRAGMENTO DE ANTICUERPO****MONOVALENTE O BIVALENTE**

5 Cuando la molécula diana es una proteína o polipéptido, se puede generar un nanoinformador en el que el armazón del nanoinformador es un ácido nucleico y la secuencia específica de la diana es un fragmento de anticuerpo monovalente o bivalente.

10 Utilizando métodos rutinarios, un anticuerpo que reconoce una molécula diana de interés se digiere óptimamente con pepsina para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Las dos partes del anticuerpo o los dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> generados mediante la digestión con pepsina se separan por medio de una leve reducción, por ejemplo con 2-mercaptoetilamina. Esta reducción separa el anticuerpo o los dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> en dos fragmentos monovalentes con dos grupos sulfhidrilo que se pueden funcionalizar.

15 Se utiliza un reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional (p. ej., éster de m-Maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida de Pierce Biotechnology Inc.) para anclar una maleimida a un oligonucleótido con una modificación amínica (que se puede tomar de muchas fuentes, tal como Integrated DNA Technologies). El NHS del reactivo de entrecruzamiento se hace reaccionar con la amina de los oligonucleótidos para producir un oligonucleótido conjugado con maleimida.

Este oligonucleótido conjugado con maleimida se hace reaccionar a continuación con uno de los grupos sulfhidrilo del fragmento de anticuerpo. Debido a las limitaciones estéricas, es preferible anclar solo un oligonucleótido a cada fragmento.

20 Este fragmento de anticuerpo monovalente o bivalente anclado a un oligonucleótido se puede hibridar a continuación a una secuencia complementaria sobre un armazón de nanoinformador, para generar una sonda informadora en la que la secuencia específica de la diana es una secuencia de anticuerpo. Tal sonda informadora se puede utilizar sola para detectar la molécula diana, o conjugada con una sonda fantasma u otra sonda informadora cuya secuencia específica de la diana es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monovalente o bivalente que se une a una porción diferente de la misma molécula diana.

**11.EJEMPLO 6: HIBRIDACIÓN DE 25 GENES CELULARES A 100 NG DE ARN TOTAL PLACENTARIO UTILIZANDO UN SISTEMA INFORMADOR NANOSTRING**

30 La detección y cuantificación de 25 genes celulares endógenos se llevó a cabo en una sola reacción de hibridación multiplexada. Además, se añadieron tres secuencias de control no humanas a cada reacción que correspondían a aproximadamente 10, 100 y 300 copias por célula, respectivamente. También se realizó una hibridación de control negativo en ausencia de ARN celular.

**11.1 REACCIÓN DE HIBRIDACIÓN**

35 Cada muestra se hibridó por triplicado. Las concentraciones finales de los reactivos de hibridación fueron las siguientes: Total de nanoinformadores 1,12 nM (28 Nanoinformadores individuales a 40 pM cada uno), total de sonda fantasma 1,12 nM (28 sondas fantasma individuales), 5X SSPE (pH 7,5), 5X reactivo de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a cizalla de 100 ng/μl, tween 20 al 0,1%, aplicación ADN S3 150 fM, aplicación ADN S4 50 fM, y aplicación ADN S6 5 fM. La concentración final de ARN placentario total fue de 33 ng/μl. No se añadió ARN placentario total a las hibridaciones de control negativo. El volumen final de la reacción fue de 30 μl. Los reactivos se mezclaron y se incubaron a 65°C en el bloque del termociclador con la tapa calefactada durante 20 horas.

40	Mezcla maestra	(1 Reacción)	(6 reacciones)
	1,8X mezcla de hibridación*	16,7 μl	100 μl
	25 informadores de genes endógenos (0,6 nM cada uno)	2 μl	12 μl
	25 sondas fantasma de genes endógenos (0,6 nM cada una)	2 μl	12 μl
	Informadores de control (0,6 nM cada uno)	2 μl	12 μl
45	Sondas fantasma de control (0,6 nM cada una)	2 μl	12 μl
	10X mezcla de la diana de control	3 μl	18 μl
	H <sub>2</sub> O	1,3 μl	8 μl
	Total	29 μl	174 μl

50 \*Mezcla de hibridación (9X SSPE, 9X reactivo de Denhardt, 180 ng de ADN de esperma de salmón, tween 20 al 0,18%)



Reacciones 123456

Mezcla maestra 29 µl 29 µl 29 µl 29 µl 29 µl

ARN placentario de 100 ng/µl 1 µl 1 µl 1 µl 1 µl 1 µl

H<sub>2</sub>O 0 µl 0 µl 1 µl 1 µl 1 µl

5 Volumen Rxn total 30 µl 30 µl 30 µl 30 µl 30 µl

Incubar las reacciones en un termociclador con tapa calefactada durante la noche (18 horas).

### 11.2 PURIFICACIÓN POST-HIBRIDACIÓN

10 Las reacciones de hibridación se purificaron para eliminar los informadores no hibridados utilizando un oligonucleótido complementario a la sonda fantasma anclada a las cuentas magnéticas (cuenta F). Las reacciones de hibridación se diluyeron 5 veces en tween 20 al 0,1% para llevar la concentración de sal a 1X SSPE y la solución se añadió a 30 µl de cuentas F (prelavadas 2 veces en 150 µl de 1X SSPE/tween 20 al 0,1%). Se dejó que los complejos hibridados se unieran a las cuentas a temperatura ambiente durante 15 minutos con rotación continua, se lavaron una vez en 150 µl de 0,5X SSPE, y se hicieron eluir en 25 µl de 0,1X SSPE durante 15 minutos a 45°C.

### 11.3 UNIÓN, ESTIRAMIENTO, E INMOVILIZACIÓN

15 Las muestras se prepararon para la unión mediante adición de 1 µl de una dilución 1/1000 de microesferas fluorescentes Tetraspec<sup>®</sup> 0,1 uM (Núm. de producto T7279, Molecular Probes) y 3 µl de bis-tris propano 1 M (pH 9,0). Las muestras se cargaron en un dispositivo Nanostring de fluidos para el anclaje a un portaobjetos Accer18 Optichem<sup>®</sup> recubierto con estreptavidina (Núm. de producto TB0200). Después de la carga, la superficie del portaobjetos se lavó una vez con 1X TAE y se preparó para el electroestiramiento por medio de la adición de 40 µl  
20 de TAE a cada pocillo. Los complejos anclados se estiraron aplicando 200 V a través del canal para fluidos. Al cabo de 1 minuto las muestras se inmovilizaron en la posición estirada añadiendo 60 µl de solución de oligos gancho G 500 mM al pocillo que contenía el electrodo cargado negativamente mientras se continuaba aplicando voltaje durante 5 minutos. Después de la inmovilización la solución de TAE se eliminó y se reemplazó por reactivo de anti-fotoblanqueamiento para la formación de imágenes.

### 11.4 FORMACIÓN DE IMÁGENES

25 Se formaron las imágenes de los portaobjetos en un Nikon Eclipse TE2000E equipado con una fuente de luz de haluro metálico (X-cite 120, Exfo Corporation) y una lente 60X para aceite de inmersión (Plan Apo VC, Nikon 1,4 AN). Para cada campo de visión, se tomaron 4 imágenes a longitudes de onda de excitación diferentes (480, 545, 580 y 622) con una cámara Orca Ag CCD (Hamamatsu) bajo el control de un programa Metamorph (Universal Imaging Corporation). Las imágenes se procesaron con programas para el tratamiento de imágenes diseñados expresamente para tal fin.  
30

### 11.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

35 Los datos primarios se extrajeron a partir de imágenes tratadas utilizando programas diseñados expresamente para tal fin. Los datos se normalizaron a los recuentos promedio para aplicaciones de control en cada muestra. Para determinar si un gen era "detectado" por el sistema, los recuentos obtenidos para cada gen de las hibridaciones que contenían ARN se compararon con los recuentos obtenidos en hibridaciones sin ARN utilizando un ensayo de la t de Student. Se determinó que se detectaban los genes con valores de p < 0,05. Después de la resta del fondo, las concentraciones del ARNm celular se estimaron a partir de la regresión lineal de las aplicaciones de controles. Estas concentraciones se convirtieron en copias por célula utilizando los siguientes supuestos: 1 célula contiene 10 pg  
40 ARN en total; cada célula contiene 300.000 moléculas de ARNm; el volumen final de la reacción es de 30 µl.

### 11.6 RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

45 La Tabla 3 de más abajo muestra los resultados de los análisis de datos descritos anteriormente. Estos resultados muestran que utilizando la tecnología de nanoinformadores descrita en la presente memoria, fue posible detectar transcritos, tales como CASP3, que están presentes a una concentración de menos de 1 transcrito/célula. De este modo, la tecnología de nanoinformadores proporciona un medio exquisitamente sensible para detectar y cuantificar la expresión génica.

Tabla 3: Concentración y Abundancia de Transcritos

Gen	Promedio de Recuentos*	error (recuentos)	concentración (fM)	error (conc.)	copias calculadas/célula	error (copia/célula)	Detectado/ No Detectado (p<0,05)
GM2A	149	17	3,39	0,39	6,12	0,07	D
ATF4	68	2	1,55	0,06	2,80	0,01	D
CTNNB1	792	50	17,95	1,19	32,44	0,22	D
IRF1	221	20	5,01	0,47	9,05	0,09	D
STAT5A	120	11	2,72	0,25	4,91	0,05	D
CREG1	409	17	9,28	0,44	16,76	0,08	D
CASP3	13	1	0,30	0,03	0,54	0,00	D
CCL20	2	1	0,04	0,03	0,07	0,01	ND
NMI	115	2	2,61	0,07	4,72	0,01	D
XBP1	719	46	16,30	1,10	29,45	0,20	D
PCGF4	75	18	1,70	0,40	3,08	0,07	D
IFI27	747	41	16,94	1,00	30,61	0,18	D
TAF7	185	11	4,19	0,26	7,57	0,05	D
OAS3	74	9	1,68	0,20	3,03	0,04	D
C2	850	49	19,28	1,19	34,83	0,21	D
IL6	8	3	0,19	0,07	0,34	0,01	D
MyD88	94	6	2,13	0,14	3,85	0,03	D
HIF1A	130	7	2,95	0,17	5,33	0,03	D
APOA2	-1	2	-0,01	-0,05	-0,03	-0,01	ND
KISS	6825	130	154,79	4,52	279,65	0,82	D
ELK3	55	4	1,25	0,09	2,27	0,02	D
CBF2	72	3	1,64	0,07	2,96	0,01	D
IF130	625	47	14,16	1,10	25,59	0,20	D
RELB	35	5	0,78	0,11	1,42	0,02	D

Gen	Promedio de Recuentos*	error (recuentos)	concentración (fM)	error (conc.)	copias calculadas/célula	error (copia/célula)	Detectado/ No Detectado (p<0,05)
CTCF	103	3	2,35	0,09	4,24	0,02	D
*Normalizados y con el fondo restado.							

Los métodos de hibridación descritos en la presente memoria se han realizado en reacciones multiplexadas sencillas que contienen hasta 120 informadores diferentes con eficacias de hibridación y resultados similares.

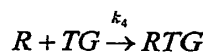
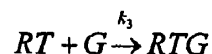
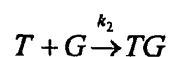
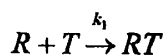
5 **12. EJEMPLO 7: CONSIDERACIONES REFERENTES A LA CINÉTICA DE HIBRIDACIÓN DEL NANOINFORMADOR**

**12.1 ANTECEDENTES**

10 Las hibridaciones en solución con un gran exceso de sonda sobre la diana siguen una cinética de pseudo-primer orden. En este régimen la velocidad de la reacción depende solo de la concentración de la sonda y no de la concentración de la diana. Para una estrategia de dos sondas, una diana para proporcionar una información exacta sobre la concentración de una diana en solución, las sondas deben estar ambas presentes en exceso con respecto a la diana. El intervalo de concentración posible está por lo tanto limitado preferiblemente en el extremo inferior por la concentración de la diana. Sin embargo, el intervalo de concentración útil para la tecnología de nanoinformadores descrita en la presente memoria está limitado prácticamente en el extremo inferior por la cantidad de tiempo necesaria para realizar la hibridación.

15 **12.2 CINÉTICA DE HIBRIDACIÓN**

En realizaciones preferidas, se realizan análisis de detección y cuantificación de la diana en los que la diana (T) debe hibridar tanto con una sonda informadora (R) como con una sonda fantasma (G) que se van a detectar (por ejemplo por medio de selección de afinidad y detección de complejos que comprenden solo (R) y (G), que a su vez solo forman complejos en presencia de (T)). Suponiendo que estas reacciones son irreversibles, se producen cuatro reacciones elementales posibles.



25 Puesto que RT y TG son complejos intermedios de dos de las tres especies, estas cuatro reacciones se pueden simplificar en



30 Sin embargo, para calcular cuantitativamente la velocidad de producción de RTG (el complejo de informador-diana-sonda fantasma), se deben considerar las cuatro reacciones. Las ecuaciones diferenciales que describen el sistema son:

$$\frac{dC_G}{dt} = -k_2 C_G C_T - k_3 C_G C_{RT} \quad \frac{dC_R}{dt} = -k_1 C_R C_T - k_4 C_R C_{TG} \quad \frac{dC_T}{dt} = -k_2 C_G C_T - k_1 C_R C_T$$

$$\frac{dC_{TG}}{dt} = k_2 C_G C_T - k_4 C_R C_{TG} \quad \frac{dC_{RT}}{dt} = k_1 C_R C_T - k_3 C_G C_{RT}$$

$$\frac{dC_{RTG}}{dt} = k_4 C_R C_{TG} + k_3 C_G C_{RT}$$

5 donde  $C_R$ ,  $C_T$ ,  $C_G$ ,  $C_{RT}$ ,  $C_{TG}$ , y  $C_{RTG}$  son las concentraciones de las diversas especies, y  $k_1$ - $k_4$  son las constantes cinéticas para las cuatro reacciones elementales. Los valores para estas constantes cinéticas cuando las sondas y las dianas son moléculas de hebra sencilla complementarias (es decir cuando no hay etiqueta de purificación sobre la sonda fantasma y no hay informador) se pueden calcular a partir de los datos disponibles en la literatura (Wetmur, J. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1976.5:337-361).

$$k = k_N \frac{\sqrt{L} \alpha_{sat}}{N \alpha_{ref}}$$

10 En la ecuación anterior,  $k_N$  es la constante de la velocidad de nucleación,  $L$  es la longitud del ácido nucleico (en pares de bases),  $N$  es la complejidad del ácido nucleico (igual a  $L$  para secuencias no repetitivas) y  $\alpha_{sat}$  y  $\alpha_{ref}$  son las correcciones para la concentración de sal (Britten et al., 1974, Methods in Enzymology 29E:363-406). En el sistema nanoinformador descrito en la presente memoria, las constantes cinéticas dependerán de los tamaños de las etiquetas de la sonda fantasma y la sonda informadora ancladas. Sin ceñirse a ninguna teoría, la creencia de los autores de la presente invención es que las constantes cinéticas tendrán la misma dependencia de la longitud que una reacción elemental tiene sobre las constantes de difusión de los reaccionantes.

$$15 \quad k = k_N \frac{\sqrt{L} \alpha_{sat}}{N \alpha_{ref}} \frac{D_1 + D_2}{2D_{50}}$$

En la ecuación anterior  $D_1$  y  $D_2$  son las constantes de difusión de las dos especies reaccionantes (véanse las reacciones anteriores) y  $D_{50}$  es la constante de difusión de una molécula de ADN de hebra sencilla de 50 unidades monoméricas. Suponiendo una diana, una sonda fantasma de hebra sencilla de 100 bases, y un informador de doble hebra de 7200 bases, las constantes cinéticas relevantes son

$$20 \quad K_1 = 2,64 \times 10^5 \text{ L/mol/s}$$

$$K_2 = 6,55 \times 10^5 \text{ L/mol/s}$$

$$K_3 = 3,99 \times 10^5 \text{ L/mol/s}$$

$$K_4 = 1,91 \times 10^5 \text{ L/mol/s}$$

25 La resolución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales con estas constantes cinéticas (suponiendo al menos un exceso de 10 veces de las sondas sobre la diana) produce la predicción de que el informador 5 pM y la sonda fantasma 5 pM llevarán a completarse la hibridación hasta 10% en una reacción durante la noche (16-18 horas). A concentraciones inferiores a 5 pM, es probable que sea poco práctico medir la cantidad de moléculas completamente hibridadas. De este modo, en una realización preferida, la concentración inferior de un componente nanoinformador (sonda fantasma y/o sonda informadora) es 5 pM.

### 30 12.3 ENTRELAZAMIENTO DE LOS INFORMADORES

A medida que las concentraciones de la sonda aumentan, la teoría pronostica que la cinética de hibridación se acelera sin límite – constituyendo el único límite la solubilidad de las sondas. Sin embargo, la sonda informadora puede ser muy grande en comparación con la secuencia específica de la diana en los sistemas de nanoinformadores de la invención. Sin ceñirse a ninguna teoría, los autores de la presente invención creen que por medio de su anclaje a la sonda informadora las cinéticas de la secuencia específica de la diana son alteradas a partir de las cinéticas de hibridación en solución clásicas. Debido a que la sonda informadora es una molécula polimérica, grande, puede tener interacciones de larga duración (entrelazamientos) con otros nanoinformadores cuando se ponen en contacto. A baja concentración la probabilidad de que dos polímeros se entrelacen es pequeña, pero a medida que aumenta la concentración y/o el tamaño de un polímero en solución, estas interacciones se vuelven más y más comunes. En el caso extremo de moléculas muy grandes a muy alta concentración los polímeros forman una red permanente, o gel, en solución. Para que se produzca hibridación en solución, un par de sonda (*p. ej.*, sonda de nanoinformador)/diana se debe difundir a través de la solución hasta que entren en contacto entre sí y se forme un núcleo de hibridación. Clásicamente, las reacciones de hibridación no están limitadas por la difusión debido a que la difusión translacional de las moléculas es más rápida que la nucleación de la hibridación (es decir, la sonda y la diana se difunden juntas e interaccionan muchas veces antes de que se produzca la nucleación). En una solución diluida su gran tamaño ralentizará la difusión translacional de la sonda informadora, pero puede no afectar significativamente a las cinéticas. A cierta concentración intermedia, las sondas informadoras ocupan casi todo el espacio en la solución, formando eficazmente un gel entrelazado permanentemente, y no se pueden difundir más en

solución. Sin embargo, la sonda fantasma y las dianas son moléculas más pequeñas que se cree que aún se difunden a través de las sondas informadoras entrelazadas, permitiendo que tenga lugar la hibridación (aunque posiblemente a una menor velocidad). Los autores de la presente invención también creen que a cierta concentración más alta la sonda informadora en solución también impedirá el movimiento de la sonda fantasma y las dianas hasta el punto de que la reacción se vuelve de difusión limitada. Esta concentración (que no es conocida cuantitativamente y depende de la estructura de la sonda informadora, la estructura de la sonda fantasma, y el tamaño de la diana) es el límite superior del intervalo de concentración útil en el sistema nanoinformador, y puede ser determinado empíricamente por un experto en la técnica guiado por los principios descritos en la presente memoria.

#### 12.4 DEPENDENCIA DE LA LONGITUD DE LA CINÉTICA

Puesto que la concentración superior limitante para la hibridación depende tanto de la estructura del informador como de la estructura de LA sonda fantasma (de las cuales hay muchas posibles variaciones), un marco teórico para pronosticar las permutaciones de los intervalos de concentración útiles es provechoso en la práctica de la invención. La teoría clásica pronostica que la cinética de hibridación depende solo del tamaño de la sonda más pequeña. La teoría podría pronosticar por lo tanto que el tamaño del informador no jugará ningún papel en la cinética de hibridación con tal que la molécula diana y la sonda fantasma sean significativamente más pequeñas. La teoría pronostica en ese caso que la velocidad de hibridación (para una longitud de la diana constante) depende de  $1/L^{1/2}$ , donde L es la longitud de la sonda fantasma, debido a la inhibición estérica de la hibridación. Por consiguiente, la cinética de hibridación será más rápida con sondas fantasma más pequeñas. A medida que aumenta la longitud de la sonda fantasma, la velocidad de hibridación deberá descender como  $1/L^{1/2}$ . Si se supone una longitud de la sonda fantasma constante, se pueden definir el intervalo de longitudes del informador y las concentraciones que darán como resultado una cantidad medible de eventos de hibridación. Una vez que se ha definido el tamaño del informador, se puede determinar el intervalo aproximado de tamaños de la sonda fantasma. Éste es un procedimiento iterativo, pero puede producir buenos puntos de partida a partir de los cuales reunir datos para generar pautas empíricas detalladas, dado que las teorías en las que están basados los fundamentos de los autores de la presente invención fueron generadas a partir de datos de hibridación en sistemas que no emplean una sonda informadora.

#### 12.5 UMBRAL DE ENTRELAZAMIENTO

Una sonda informadora es esencialmente un polímero en solución libre, que se comporta como una espiral al azar. El volumen ocupado por un solo informador,  $V_p$ , se puede calcular a partir de las teorías físicas de polímeros de acuerdo con el modelo de la Cadena Articulada Librementemente ("FJC en sus siglas en Inglés", para un polímero flexible, tal como un ADN o ARN de hebra sencilla) o el modelo la Cadena Vermiforme ("WLC en sus siglas en Inglés", para un polímero rígido tal como ADN de doble hebra o un informador). Para cualquier modelo

$$V_p = \frac{4}{3} \pi R_g^3$$

donde  $R_g$  es el radio de giro. Para la FJC

$$R_g = b \left( \frac{N}{6} \right)^{0.6}$$

Donde b es la longitud del segmento y N es el número de segmentos en la cadena. Para la WLC

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{6} N b^2 - \frac{b^2}{4} + \frac{b^2}{4N} \left( 1 + \frac{1}{2N} (e^{-2N} - 1) \right)}$$

La concentración umbral de entrelazamiento se define como la concentración a la que el volumen completo de la solución está ocupado por los informadores.

$$C^* = \frac{3}{4\pi R_g^3 N_A}$$

donde  $N_A$  es el número de Avogadro. Por encima de esta concentración se supone que la difusión translacional de los informadores está fuertemente restringida. La concentración umbral de entrelazamiento varía con la estructura del informador. A medida que aumenta la longitud del informador, el umbral de entrelazamiento disminuye (como  $1/L^{1.5}$ ). A partir de las ecuaciones anteriores, se puede calcular el umbral de entrelazamiento teórico para sondas informadoras con diferentes tamaños de mancha y diferentes longitudes. El resultado de tales cálculos se muestra

en la Figura 17, que muestra que para una sonda informadora híbrida de ARN/ADN de 7200 pb con 8 regiones de anclaje de la marca de alrededor de 900 pb cada una, el umbral de entrelazamiento es de alrededor 70 nM.

Si tanto la diana como la sonda fantasma son mucho más pequeñas que los informadores, será más probable que estén libres para difundirse a través de la solución incluso a estas altas concentraciones de informadores. Los datos iniciales indican que la cinética de hibridación no se ralentiza apreciablemente hasta una concentración de 80 nM con una sonda informadora de 7200 pb, una diana de 100 bases, y una sonda fantasma de 100 bases.

**12.6 EFECTO DEL UMBRAL DE ENTRELAZAMIENTO SOBRE EL MULTIPLEXADO**

Suponiendo que la concentración máxima para los informadores en una reacción de hibridación es C\*, la concentración de cada informador (específica para una diana concreta) es igual a C\*/M, donde M es el múltiplex de la reacción (número de diferentes dianas que están siendo tomadas en consideración simultáneamente). En cambio, el nivel de múltiplex posible para una estructura de informador concreta se puede calcular a partir del límite inferior de concentración de la sonda (Cp de la cinética ~10 nM) y del umbral de entrelazamiento

$$M = \frac{C^*}{C_p}$$

Si el número de códigos de nanoinformador disponible no depende del tamaño de la sonda informadora, el multiplexado del nanoinformador depende principalmente del tamaño de la sonda informadora y de la concentración (puesto que es mucho mayor que la sonda fantasma). Debido a que la sonda fantasma hace una contribución insignificante al entrelazamiento durante la hibridación, es por lo que los autores de la presente invención creen que la concentración de la sonda fantasma se puede aumentar bastante por encima de la concentración de la sonda informadora. En Tabla 4 de más abajo, la concentración de sonda fantasma total máxima ([G]) se ajusta a 1000 nM para todas las concentraciones de informador. Esta diferencia de concentración de sonda fantasma y sonda informadora es un parámetro ajustable. Experimentos preliminares muestran que en una reacción de hibridación múltiplex con un informador de 7200 pb y un fantasma de 100b, 40pM de cada sonda informadora y 200 pM de cada sonda fantasma dan como resultado casi una hibridación completa en una reacción durante la noche.

**12.7 INTERVALOS DE TAMAÑO Y CONCENTRACIÓN ÓPTIMOS**

Más abajo en la Tabla 4 hay un resumen de los intervalos de tamaño y de concentración útiles óptimos de la sonda fantasma y la sonda informadora a diferente multiplexado según se ha estimado por medio de las teorías anteriores. La creencia de los autores de la presente invención es que sondas fantasma de hasta alrededor de 200 bases serán prácticas para la mayoría de las aplicaciones.

Longitud Informadora (pb)	Longitud Fantasma (b)	[R] (pM Mínima)	[G] (pM Mínima)	[R](nM) Máxima	[G](nM) Máxima	Multiplex Máx.
2000	100	5	5	603	1000	114417
2000	50	4	4	603	1000	161811
2000	200	7	7	603	1000	80905
3000	100	6	6	292	1000	45182
3000	50	5	5	292	1000	63897
3000	200	9	9	292	1000	31948
4000	100	7	7	178	1000	23912
4000	50	5	5	178	1000	33817
4000	200	11	11	178	1000	16908
5000	100	8	8	123	1000	14746

Longitud Informadora (pb)	Longitud Fantasma (b)	[R] (pM Mínima)	[G] (pM Mínima)	[R](nM Máxima)	[G](nM Máxima)	Multiplex Máx.
5000	50	6	6	123	1000	20854
5000	200	12	12	123	1000	10427
6000	100	9	9	91	1000	9988
6000	50	6	6	91	1000	14125
6000	200	13	13	91	1000	7062
7200	100	10	10	68	1000	6792
7200	50	7	10	68	1000	6792
7200	200	14	10	68	1000	6792
8000	100	11	11	57	1000	5444
8000	50	7	7	57	1000	7699
8000	200	15	15	57	1000	3850
10000	100	12	12	40	1000	3419
10000	50	8	8	40	1000	4835
10000	200	17	17	40	1000	2417

Tabla 4: Intervalos de tamaño y de concentración útiles óptimos de la sonda informadora, la sonda fantasma y la diana, así como multiplicidad de sondas, en los sistemas nanoinformadores de la invención.

### 13.EJEMPLO 8: REALIZACIONES ILUSTRATIVAS PARA EN ENSAMBLAJE DE UN NANOINFORMADOR DUAL

- 5 Esta sección describe una realización para el ensamblaje de un nanoinformador dual en el que una sonda es una sonda fantasma y la otra sonda es una sonda informadora que comprende segmentos de ARN coloreados ensamblados sobre un esqueleto de M13. La sonda fantasma se ancla a un gancho F biotinilado y la sonda informadora se ancla a un gancho G biotinilado. El nanoinformador dual se hibrida a una muestra biomolecular para detectar y cuantificar una molécula diana. Las etapas de más abajo no tienen que ser realizadas en el orden presentado. Por otra parte, cada etapa concreta representa una realización específica que se puede combinar con realizaciones distintas de las presentadas más abajo.

#### 13.1 PREPARACIÓN DEL ARMAZÓN DE M13

- 15 El ADN M13mp18 circular de hebra sencilla (USB Corporation) se recuece hasta un exceso 5 veces molar de un oligonucleótido complementario al sitio de reconocimiento Bam HI (oligo Cortador Bam) y se corta con la enzima de restricción Bam HI para producir una cadena principal de ADN de hebra sencilla lineal. Con posterioridad se añade un oligonucleótido complementario al oligonucleótido Cortador Bam (anti-oligonucleótido Bam) en un exceso de 50 veces para secuestrar el oligonucleótido Cortador Bam y evitar de este modo la recircularización de M13 durante las últimas etapas.

- 20 La molécula de M13 lineal sirve como un almacén sobre el que se pueden recocer parches de ARN, o segmentos de ARN, con fluoróforos incorporados.

**13.2 ANCLAJE DE UNA SECUENCIA ESPECÍFICA DE LA DIANA AL ARMAZÓN**

Se genera un oligonucleótido que comprende una secuencia (de, *p. ej.*, 30-70 nucleótidos) complementaria a la diana de ácido nucleico de interés, más 9 pb de secuencia adicional utilizada para la ligación al armazón de M13, y se liga al extremo 3' del armazón linealizado de M13.

**5 13.3 ANCLAJE DE ETIQUETAS G AL ARMAZÓN**

Una etiqueta G (*p. ej.*, un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-AACATCACACAGACC AACATCACACAGACC AACATCACACAGACC AACATCACACAGACC AGCCCTTTG-3', que incluye 4 copias del complemento del gancho G 5'-GGTCTGTGTGATGTT-3', seguido de 9 bases de la secuencia del ligador, y que es complementario al gancho G) se ancla al extremo 5' del esqueleto de M13 de hebra sencilla linealizado para permitir (1) la purificación del informador después de la ligación y/o el recocido de segmentos; y (2) la inmovilización del informador una vez que es "estirado" sobre una superficie sólida. La secuencia del ligador para el anclaje de la etiqueta G al extremo 5' de M13 de hebra sencilla que ha sido linealizado en el sitio BamHI puede ser 5'-CTCTAGAGGATCCAAAGGGCT-3'. La reacción de ligación se puede realizar de acuerdo con el siguiente protocolo para producir aproximadamente 80 pmoles de un producto de ligación de etiqueta G/M13:

**15 Materiales:**

anti-oligo etiqueta G4 [100uM]  
 anti-oligo ligador etiqueta G4 [100uM]  
 M13 de hebra sencilla lineal [80 nM]  
 10X Tampón de ADN Ligasa de T4 (Fermentas)  
 20 ADN Ligasa de T4 (Fermentas)  
 20X SSC (Ambion)  
 H2O DEPC (Ambion)

**Método:**

1. Pre-recocer la etiqueta G y el ligador:

25 G/ligG 2:1 25uM en 1X SSC  
 20 µl de Ligador etiqueta G [100uM]  
 40 µl de etiqueta G [100uM]  
 4 µl de 20X SSC  
 16 µl de H2O DEPC  
 30 \* Recocer sobre el Termociclador MJ  
 95°C, 3 min; 72°C, 30 seg, -1°C/ciclo, x 68 ciclos; mantener a 4°C

2. Ligar la etiqueta G al M13 lineal:

M13-G4 64 nM en 1X Tampón de Lig  
 1000 µl de M13 Lineal [80 nM]  
 35 80 µl de G/ligG 2:1 [25uM] en 1X SSC  
 124 µl de 10X Tampón de ADN Ligasa de T4  
 40 µl de ADN Ligasa de T4

\* Ligar en un bloque de calentamiento de aluminio cubierto con aluminio a 37°C durante 2 hr, a continuación a 65°C durante 15 minutos para inactivar la enzima.

**40 13.4 PREPARACIÓN DE LOS SEGMENTOS DE ARN**

Se diseñan 10 juegos de pares de cebadores oligonucleotídicos para crear 10 regiones diferentes a lo largo del armazón de M13. Cada par contiene un cebador que tiene un promotor de la ARN polimerasa de T7 en el extremo



5'. Las regiones 2-7 se diseñan para que tengan 900 bases (aproximadamente 300 nm) de longitud, puesto que éste es el tamaño aproximado de una mancha de difracción limitada (la mancha más pequeña que se puede lograr con una óptica convencional). Las regiones 1 y 8 tienen ambas versiones largas y cortas: Las versiones largas cubren la región de 900 bases completa, mientras que las versiones cortas cubren solo una porción de la región de 900 bases para permitir que se ligue una secuencia específica de la diana. De este modo se puede anclar a cada extremo una secuencia específica de la diana. Los extremos también se pueden usar para la agregación de anclas y etiquetas.

La PCR se realiza utilizando polimerasa Taq y 0,5 ng de M13mp18 de doble hebra (USB Corporation) como molde. Las reacciones se limpian utilizando un kit de purificación Qiaquick de Qiagen. Cada reacción de PCR produce un fragmento de doble hebra que corresponde a un segmento específico como se ilustra más abajo. Estos fragmentos se utilizan como moldes para la transcripción in vitro de los segmentos de ARN.

Utilizando los productos de la PCR descritos anteriormente como moldes de doble hebra, se generan segmentos de ARN utilizando un kit de transcripción in vitro de Ambion (kit Megascript T7). Los productos de las reacciones de transcripción se purifican (incluyendo el tratamiento con ADNasa I para eliminar el molde) utilizando el Kit RNeasy de Qiagen.

### 15 13.5 MARCAJE DE LOS SEGMENTOS DE ARN

Utilizando los productos de la PCR descritos anteriormente en forma de moldes de doble hebra, se generan segmentos de ARN para el posterior acoplamiento al colorante utilizando un kit de transcripción in vitro de Ambion (kit MessageAmp aRNA). Los nucleótidos de UTP modificados con aminoalilo se incorporan a los segmentos de ARN durante la transcripción. Los productos de las reacciones de transcripción se purifican (incluyendo el tratamiento con ADNasa I para eliminar el molde) utilizando un Kit RNeasy de Qiagen.

Se acoplan 20-100 µg de segmentos de ARN modificados con aminoalilo a colorantes de éster de NHS utilizando Ambion Aminoallyl Labeling Kit. Los colorantes utilizados incluyen Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647 (Invitrogen/Molecular Probes) así como Cy3 (Amersham).

Cada segmento se elabora separadamente en 4 colores de manera que cada posición en el armazón se puede rellenar con un segmento en cualquiera de los cuatro colores; de este modo se pueden añadir diferentes colores a diferentes posiciones para crear muchas combinaciones de color únicas.

En esta realización concreta, los segmentos adyacentes son de diferentes colores o puede haber segmentos oscuros intercalados de manera que cada segmento se detecta en forma de una 'mancha' individual. Los segmentos oscuros se pueden utilizar como parte del código del nanoinformador.

### 30 13.6 RECOCIDO DE LOS SEGMENTOS DE ADN AL ARMAZÓN

Los segmentos para cada posición se recuecen a una proporción 2:1 de segmento con respecto al armazón de M 13 en 1X tampón de SSPE a 70°C durante 2 horas. Un nanoinformador ensamblado con segmentos de ARN marcados se representa en la Figura 3A-3B. La Figura 3A representa un nanoinformador en el que solo se marcan "manchas" alternas (1, 3, 5 y 7), y la Figura 3B representa un nanoinformador en el que se marca cada mancha.

### 35 13.7 PREPARACIÓN DE LA SONDA FANTASMA

Se generan uno o más oligonucleótidos que comprenden secuencias (de, *p. ej.*, 30-70 nucleótidos) complementarias a diferentes regiones del ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana de interés de aquellas a las cuales son complementarias las secuencias específicas de la diana de la sonda informadora. Opcionalmente, las etiquetas F para el anclaje del gancho F se ligan al extremo 5' de la sonda fantasma utilizando un oligonucleótido ligador que es complementario a una secuencia corta en el extremo 3' del gancho F así como a una secuencia corta en el extremo 5' de la sonda fantasma. Las secuencias que son complementarias al oligonucleótido ligador no son parte de la secuencia del gancho F o la secuencia de la sonda, pero son nucleótidos adicionales añadidos a esos oligos con el fin de facilitar la ligación.

### 45 13.8 ANCLAJE DE ETIQUETAS F A LA SONDA FANTASMA

Una etiqueta F (*p. ej.*, un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-GATGGAGAC GTCTATCATCACAGC GTCTATCATCACAGC-biotina-3', que incluye 2 copias del complemento del gancho F 5'-GCTGTGATGATAGAC -3', seguido de 9 bases de la secuencia del ligador y es complementario al gancho F) se ancla al extremo 3' de la sonda fantasma para permitir (1) la purificación del complejo de hibridación fantasma-sonda-diana-informador; y (2) el anclaje del complejo de hibridación sobre el porta a través del residuo de biotina. La secuencia del ligador para anclar la etiqueta F al extremo 3' de la sonda fantasma puede ser 5'-GTCTCCATCTTCCGACAG-3'.

#### Materiales:

etiqueta de biotina F 100 uM

ligador de sonda fantasma F 100 uM

10X Tampón de ADN Ligasa T4 Fermentas

sondas fantasma 1 uM

ADN Ligasa de T4 Fermentas

**Método:**

5 1. Pre-recocer el gancho y el ligador:

mezcla de etiqueta de biotina F/ligador 5 uM

5 µl de etiqueta de biotina F [100 uM]

5 µl de ligador de sonda fantasma F [100 uM]

10 µl de 10X Tampón de ADN Ligasa de T4

10 80 µl H<sub>2</sub>O DEPC

Recocer sobre el Termociclador MJ (95°C, 3 min; 72°C, 30 seg, -1°C/ciclo x 68 ciclos; mantener a 4°C).

2. Establecer la siguiente ligación de la sonda fantasma:

anti-biotina F2-GP 300 nM

6,0 µl de Sonda Fantasma [1 uM]

15 4,8 µl de mezcla de etiqueta anti-biotina F2/ligador [5 uM]

1,52 µl 10X Tampón de ADN Ligasa de T4

3,68 µl de H<sub>2</sub>O DEPC

4,0 µl de ADN Ligasa de T4

Ligar sobre el Termociclador MJ (37°C, 18 hr; 65°C, 15 minutos; mantener a 4°C)

20 3. QC la ligación en un gel de TBE-Urea al 15% Novex:

Preparar las siguientes soluciones de carga:

Ligación	Control Neg-Sonda Fantasma
3,33 µl de ligación [300 nM]	1 µl de sonda fantasma [1 uM]
1,67 µl de H <sub>2</sub> O DEPC	0,33 µl de 10X Tampón de ADN Ligasa de T4
5 µl de 2X Tampón de Carga	3,67 µl de H <sub>2</sub> O DEPC
	5 µl de 2X Tampón de Carga

Mezcla de Control Neg - etiqueta de biotina F/ligador

2 µl de mezcla de etiqueta de biotina F/ligador [0,5 uM]

0,33 µl de 10X Tampón de ADN Ligasa de T4

30 2,67 µl de DEPC H<sub>2</sub>O

5 µl de 2X Tampón de Carga

50 pb de Cadena de Oligos

4 µl de Cadena

6 µl de 2X Tampón de carga

35 Ronda de un gel de TBE-Urea al 15% Novex a 180V durante 50 minutos.

Tefñir con SYBR Gold durante 30 minutos.

### 13.8.1 REALIZACIONES ALTERNATIVAS

En lugar de acoplar covalentemente biotina a la etiqueta F de hebra sencilla, la biotilación de la sonda fantasma se puede completar también recociendo un oligonucleótido biotilado (ADN o ARN) a una secuencia complementaria a la porción común de la sonda fantasma. Tal secuencia podría ser la propia secuencia F, u otra secuencia que se añada a la sonda fantasma además de la secuencia F. Si se añade tal secuencia adicional, ésta podría tener de 10 a 100 bases de longitud, de 1 a 10 copias, siendo la configuración preferida una sola copia de 50 a 100 bases de longitud.

### 13.9 BIOTINILACIÓN DEL ARNm DIANA

Existen varios kits asequibles comercialmente disponibles para el marcaje directo de una muestra de ARNm incluyendo *Label IT*®  $\mu$ Array® Biotin Mirus Núm. MIR 8010) y Biotin-Chem-Link (Roche (1 812 149). Siguiendo los procedimientos de fabricante se añade el ARNm marcado con biotina a la reacción de hibridación como se ha descrito en la Sección 3d (más abajo) con las siguientes modificaciones: Puesto que la mayoría de los protocolos sugieren el uso de ARNm poli A+, la cantidad de ARN utilizado se podría reducir de menos de 100 ng de ARN total en una hibridación típica a 10 ng y posiblemente 1 ng. No se debe añadir sonda fantasma a esta reacción. No se requiere más purificación post-hibridación de la cuenta F. Se debe utilizar purificación post-hibridación de la cuenta G para eliminar el ARNm biotilado no hibridado que podría competir por la unión al portaobjetos. Dependiendo de la cantidad de ARN utilizado, esto se puede requerir o no. Alternativamente, el ARN total se podría biotilar sin la necesidad de purificación de la fracción poli A+. En este caso, se debe utilizar la cantidad original de ARN total (100 ng). El uso del ARN total puede requerir modificaciones del protocolo del fabricante para aumentar la eficacia de marcaje.

Un enfoque alternativo sería generar enzimáticamente ADNc de la 1ª hebra biotilado o ARN amplificado biotilado (ARNa) utilizando kits disponibles en el mercado y utilizar estos en lugar de ARN total o ARNm. Este enfoque requeriría un rediseño de las sondas informadoras para que estuvieran en orientación efectora. Tanto la sonda fantasma como las reacciones de post-hibridación de la cuenta F se omitirían mientras que la purificación de la cuenta G permanecería para la eliminación del ARN no hibridado.

### 13.10 HIBRIDACIÓN DEL NANOINFORMADOR DUAL A LA DIANA

Muchas condiciones de hibridación son suficientes para lograr los datos de expresión génica. Para acortar el tiempo de hibridación a la vez que se mantiene una eficacia de hibridación razonable, se pueden alterar varios parámetros: i) aumento de las concentraciones de sonda fantasma y de informador, ii) fragmentación del ARN total hasta un tamaño medio de 200-500 pb mientras se reduce el pH de hibridación a 6,5, iii) utilización de más ARN total en el mismo volumen de hibridación, iv) reducción del volumen de hibridación a aproximadamente 10  $\mu$ l. Se pueden retirar reactivos de bloqueo tales como Denhardt y ADNhs sin efectos perjudiciales sobre la eficacia de hibridación o hibridación cruzada con los ARNm de especies diferentes.

El siguiente protocolo se ha realizado satisfactoriamente multiplexando de 1 a >500 nanoinformadores con sondas fantasma (un ejemplo demostrativo de un análisis con nanoinformadores que utiliza 25 nanoinformadores se describe en el ejemplo 6 anterior, y otro ejemplo demostrativo de un análisis con nanoinformadores que utiliza 509 nanoinformadores se describe en ejemplo 9 más abajo). La concentración final de todos los nanoinformadores varía dependiendo de 1) la concentración de cada informador y 2) el número de genes que estén siendo multiplexados.

Las concentraciones de nanoinformador totales típicas oscilan de 40 pM (1 gen @ 40pM) a 20 nM (500 genes @40pM). Las concentraciones de la sonda fantasma también varían de 200pM (1 gen @ 200 pM) a 100 nM (500 genes @ 200 pM). El siguiente ejemplo describe una hibridación multiplexada sencilla que contiene aproximadamente 500 genes endógenos con controles positivos y negativos. Añadir, 11,1  $\mu$ l de 2,7X mezcla de hibridación [13,5X SSPE pH 7,5 (USB Núm.75890), 0,27  $\mu$ g/ $\mu$ l de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla (Sigma Núm. D-7656), tween 20 al 0,27% (Sigma Núm. P-1379), y 13,5X reactivo de Denhardt (Sigma D-2532)], 5  $\mu$ l de mezcla de Nanoinformador génico (0,24 nM de cada o 123 nM en total, incluye 509 genes endógenos y 8 controles de hibridación), 4,6  $\mu$ l de la mezcla de la sonda fantasma de 513 genes (1,3 nM de cada o 667 nM en total, incluye 509 genes endógenos y 8 controles de hibridación), 1  $\mu$ l de mezcla de informador de control para la purificación (0,5 pM), 1  $\mu$ l de ARN celular total (100 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de 30X aplicación de la mezcla de la diana (1,5 nM-3 fM) y 6,3  $\mu$ l de agua tratada con DEPC (Ambion Núm. 9922) a un tubo de pared delgada de 0,2 ml (volumen final 30  $\mu$ l).

La concentración final de los reactivos de hibridación debe ser 5X SSPE, tween 20 al 0,1%, 100 ng/ $\mu$ l de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, 5X reactivo de Denhardt, 40 pM de cada Nanoinformador (~20 nM en total), 200 pM de cada sonda fantasma (~100 nM en total) y 33 ng/ $\mu$ l de ARN celular total. Las aplicaciones de la dianas de control varían por lo general a lo largo de un intervalo de 50 M a 0,1 fM en una sola reacción. Todos los reactivos carecen muy preferiblemente de cualquier actividad nucleasa. Para resultados óptimos, todos los reactivos deben carecer de actividad nucleasa.

Mezclar bien los reactivos e incubar en un bloque de temperatura con tapa calefactada durante 20 horas. Después de la hibridación purificar los nanoinformadores con reactivos de afinidad tanto para la sonda fantasma como para la sonda informadora.

### 5 13.10.1 REALIZACIÓN ALTERNATIVA: PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN SIN ADNhs NI REACTIVO DE DENHARDT

Este protocolo ha sido realizado satisfactoriamente con multiplexado de 1-500 nanoinformadores y sondas fantasma. La eliminación del ADNhs y del reactivo de Denhardt de las hibridaciones realizadas con reactivos humanos (Nanoinformadores y sondas fantasma) no tuvo efecto sobre la hibridación cruzada con ARN total de ratón cuando se comparó con una hibridación que contenía ADNhs y reactivo de Denhardt. Por añadidura, la eliminación del ADNhs y del reactivo de Denhardt no da como resultado un aumento de la señal del fondo (basándose en controles de hibridación negativos). Finalmente, no hubo una pérdida (o ganancia) significativa de señal para los genes endógenos hibridados en presencia o ausencia de ADNhs y reactivo de Denhardt (509 genes, valor de  $R^2 = 0,998$ ).

### 13.10.2 REALIZACIÓN ALTERNATIVA: CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN PARA ARNm CELULAR FRAGMENTADO

15 Se ha logrado la fragmentación de ARN celular por medio de protocolos de catálisis térmica y catálisis con cationes. Estos protocolos se diseñaron para obtener longitudes de fragmentos entre 100 y 700 pb (de promedio). Fragmentación térmica: Diluir la muestra de ARN total hasta 200 ng/ $\mu$ l en agua sin ARNasa. Calentar la muestra a 95°C en un bloque de temperatura con tapa calefactada. Detener la fragmentación colocando la muestra sobre hielo. Utilizar inmediatamente o almacenar a -80°C hasta su uso. Fragmentar a través de una reacción catalizada con cationes modificada a partir del protocolo del fabricante (Ambion). Llevar el volumen de la muestra de ARN hasta 9 20  $\mu$ l con agua sin ARNasa. La concentración final del ARN total debe estar entre 0,2 y 2  $\mu$ g/ml. Añadir 1  $\mu$ l de 10X tampón de fragmentación (10X tampón de fragmentación Ambion). Incubar a 70°C durante 5 minutos en un bloque de temperatura. Tiempos más prolongados darán como resultado un tamaño de fragmento más pequeño de promedio. Detener la reacción por medio de la adición de 1  $\mu$ l de EDTA 200 mM. Utilizar inmediatamente o 25 almacenar a -80°C hasta su uso.

Las muestras de ARN fragmentadas se hibridan como se describe en la presente memoria excepto por las siguientes modificaciones: i) el pH de SSPE se reduce a 6,5 y ii) el tiempo de reacción se reduce a 6 horas (para las reacciones de hibridación en las que las concentraciones de la sonda informadora y la sonda fantasma son 200 pM).

### 13.11 PURIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE NANOINFORMADOR-DIANA

30 Se prefiere la purificación post-hibridación cuando la concentración total de la sonda informadora está por encima de 1 nM. La purificación disminuye significativamente la unión no específica y aumenta la eficacia de la unión específica en el portaobjetos a concentraciones más altas de sonda informadora y fantasma. En el ejemplo proporcionado anteriormente, se describe una purificación de la cuenta F (purifica complejos hibridados a partir del extremo de la sonda fantasma). Como se ha descrito en el ejemplo 9 de más abajo, se obtienen resultados óptimos a altas 35 concentraciones de sonda fantasma (>5 nM en total) a través de la posterior purificación de la cuenta G que purifica los complejos de hibridación a partir del extremo 5' del informador eliminando eficazmente el exceso de sondas fantasma no hibridadas. El orden de purificación preferido es la cuenta F, a continuación la cuenta G pero el orden se puede invertir y optimizar los protocolos como corresponda. Las secuencias exactas utilizadas en estas purificaciones de afinidad se pueden cambiar y optimizar probablemente en realizaciones alternativas de la 40 tecnología. Estas etapas de purificación de afinidad y los reactivos están basados actualmente en ácidos nucleicos pero podrían ser teóricamente cualquier clase de pares de unión que exhiban una unión específica entre sí y puedan ser liberados por medio de tratamiento químico o alteración de las condiciones de unión de manera que la interacción se interrumpa y se libere. Por ejemplo, un par anticuerpo/antígeno, una interacción proteína/metal, o una interacción ligando/receptor, etc.

45 Un ejemplo de purificación se proporciona más abajo.

Una vez completada la hibridación, la sal de una muestra de hibridación (30  $\mu$ l, partiendo de 5x SSPE =  $\text{Na}^+$  825 mM) se ajusta a una concentración final de aproximadamente 1x SSPE. La muestra diluida se añade a 30  $\mu$ l de gancho F MyOne Dynabeads (F-MODB) y se une durante 15 minutos a temperatura ambiente mientras se hace rotar. Las cuentas se secuestran con un imán y se elimina el sobrenadante. Las cuentas se lavan dos veces con 150 50  $\mu$ l de 0,1xSSPE + Tween al 0,1% a temperatura ambiente durante 15 minutos de w/rotación y se descartan. Los informadores purificados se hacen eluir en 30  $\mu$ l de 0,1x SSPE a 45°C durante 15 minutos de w/rotación. En este momento los informadores hibridados se purifican a partir de los informadores no hibridados contaminantes. La elución aún contiene sondas fantasma no hibridadas contaminantes que competirán con los informadores para los sitios de unión a la biotina en el portaobjetos recubierto con estreptavidina. Los 30  $\mu$ l se añaden a 130  $\mu$ l de 1xSSPE + Tween al 0,1% para aumentar la concentración de sal. La muestra (150  $\mu$ l) se carga a continuación en 30  $\mu$ l de G-MODB y se une durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descarta y las cuentas se lavan con 150  $\mu$ l de 0,1xSSPE + Tween al 0,1% a temperatura ambiente durante 15 minutos de w/rotación. El lavado se 55 descarta y los informadores completamente purificados se hacen eluir con 25  $\mu$ l de 0,1x SSPE a 45°C durante 15

minutos de w/rotación. En este momento solo las moléculas diana que se hibridan tanto a la sonda fantasma (que contiene la anti-secuencia F) y un informador (que contiene la anti-secuencia G) permanecerán en solución.

### 13.12 INMOVILIZACIÓN Y ESTIRAMIENTO Y FORMACIÓN DE IMÁGENES DE LOS COMPLEJOS DE NANOINFORMADOR-DIANA

5 El anclaje al portaobjetos y la inmovilización del complejo estirado se puede lograr a través de una interacción biotina-estreptavidina. En realizaciones alternativas, la inmovilización y el estiramiento se logran con otros pares de interacción siempre que uno de los dos pueda ser inmovilizado sobre el portaobjetos y el otro anclado a la sonda fantasma o al informador. El estiramiento no tiene porque ser logrado a través de electroforesis sino que se puede realizar mecánicamente. No se requiere la adición de bis-tris propano a la muestra antes de la unión. La tecnología  
10 no está limitada al uso de los monómeros marcadores concretos ilustrados en la presente memoria con tal que los diferentes monómeros marcadores se puedan separar por medio de tratamiento de imágenes.

Un ejemplo de un protocolo de inmovilización y estiramiento se proporciona más abajo.

Después de la purificación, los productos de hibridación se pueden cargar directamente en un pocillo abierto de un dispositivo microfluídico. El líquido se impele a un canal microfluídico por medio de acción capilar donde las  
15 moléculas hibridadas se unen al portaobjetos recubierto de estreptavidina a través de una sonda fantasma biotinilada. El dispositivo microfluídico a continuación se inclina intermitentemente a lo largo del eje perpendicular a la longitud de los canales en direcciones alternas con el fin de forzar que la mezcla reacción pase repetidamente a través del canal y aumente la eficacia de unión.

Después de unir la reacción de hibridación, el canal se lava con 1x TAE durante 5 minutos inclinando el dispositivo a un ángulo. A continuación se añade TAE de nueva aportación a cada pocillo hasta un nivel suficiente para poner en  
20 contacto los electrodos de platino que se insertan en los pocillos (30 microlitros en la geometría habitual de los autores de la presente invención). A continuación se aplica un potencial eléctrico de 200 V entre los dos pocillos conectados por el canal microfluídico, estirando los informadores. Al cabo de un minuto de pre-electroforesis para eliminar cualquier molécula informadora no unida contaminante que quede en el canal, se añade una solución de  
25 gancho G 0,5 µM en 1x TAE al pocillo catódico (60 microlitros de esta solución). El potencial eléctrico retira el gancho G a través del canal hacia el pocillo anódico. A medida que pasan a través del canal, los ganchos hibridan con las secuencias de la etiqueta G libres en el extremo libre de los informadores que se unen a la superficie y se estiran. La estreptavidina sobre la superficie se une a continuación a la biotina del gancho G e inmoviliza el extremo libre. Cuando se retira el potencial, los informadores permanecen estirados para formar las imágenes.

### 30 14. EJEMPLO 9: HIBRIDACIÓN DE 509 GENES CELULARES A 100NG DE ARN TOTAL A PARTIR DE CÉLULAS A549 UTILIZANDO UN SISTEMA INFORMADOR NANOSTRING.

#### 14.1 REACCIÓN DE HIBRIDACIÓN

La detección de 509 genes celulares endógenos se llevó a cabo en una sola reacción de hibridación mutiplexada. Se aplicaron ocho secuencias de control no humanas a cada reacción que correspondían a aproximadamente 0,1, 0,5,  
35 1, 5, 10, 50, y 100 copias por célula así como dos informadores sin diana (controles negativos). También se añadieron 4 informadores que sirvieron como controles positivos (3) y negativos (1) para el procedimiento de purificación post-hibridación. También se realizó un grupo de hibridación de control negativo que contenía la genoteca de informadores Nanostring completa pero sin ARN celular.

Cada muestra se hibridó por triplicado. Las concentraciones finales de los reactivos de hibridación fueron las siguientes: total de Nanoinformadores 20,8 nM (521 nanoinformadores individuales a 40 pM cada uno), total de sonda fantasma 103 nM (517 sondas fantasma individuales @ 200 pM cada una), 5X SSPE (pH 7,5), 5X reactivo de Denhardt, 100 ng/ul de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, tween 20 al 0,1%, aplicación ADN S11 50 fM, aplicación ADN S10 10 fM, aplicación ADN S9 5 fM, aplicación ADN S8 1 fM, aplicación ADN S7 0,5 fM,  
45 aplicación ADN S6 0,1 fM. Se añadieron S3 y S4 como controles negativos. El ARN se obtuvo de células epiteliales de pulmón A549 en dos estados diferentes. La concentración final de ARN total por hibridación fue de 33 ng/ul. No se añadió ARN total a las hibridaciones de control negativo. El volumen final de la reacción fue de 30 ul. Los reactivos se mezclaron y se incubaron a 65°C en un bloque de termociclador con tapa calefactada durante 20 horas.

Mezcla maestra	(1 Reacción)	(9,3 reacciones)
2,7 X mezcla de hibridación*	11,1 µl	103,2 µl
50 513 informadores de genes endógenos (0,24 nM cada uno)	5 µl	46,5 µl
513 sondas fantasma de genes endógenos (1,3 nM cada uno)	4,6 µl	42,9 µl
Informadores de Purificación de Control (0,6 nM cada uno)	1 µl	9,3 µl
30X mezcla diana de control	1 µl	9,3 µl

Total	22,7 µl									211,2 µl
Mezcla de Hibridación* (13,5X SSPE, 13,5X reactivo de Denhardt, 270 ng de ADN de espermatozoos de salmón, tween 20 al 0,27%)										
Reacciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
5 Mezcla maestra		22,7	22,7	22,7	22,7	22,7	22,7	22,7	22,7	22,7
48,5 ng/µl de ARN Núm. 1		2,1	2,1	2,1	0	0	0	0	0	0
48,4 ng/µl de ARN Núm. 2		0	0	0	2,1	2,1	2,1	0	0	0
H <sub>2</sub> O		5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	7,3	7,3	7,3
Volumen Rxn total		30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

10 Incubar las reacciones en un termociclador con tapa calefactada durante la noche (20 horas).

#### 14.2 PURIFICACIÓN POST-HIBRIDACIÓN

15 Las reacciones de hibridación se purificaron para eliminar los informadores no hibridados utilizando un oligonucleótido complementario a la sonda fantasma anclada a las cuentas magnéticas (cuenta F). Las reacciones de hibridación se diluyeron 5 veces en Tween 20 al 0,1%/TE para llevar la concentración final de sal a 1X SSPE. La solución de hibridación diluida se añadió a continuación a 100 µl de cuentas F (en Tween 20 al 0,1%) y se dejó que se uniera a las cuentas a temperatura ambiente durante 30 min con rotación continua. Las cuentas se lavaron a continuación tres veces en 150 µl de 0,1X SSPE/Tween 20 al 0,1% y se hicieron eluir en 100 µl de 0,1X SSPE/Tween 20 al 0,1% durante 15 min a 45°C.

20 Después de la elución de las cuentas F, las muestras se purificaron a partir del extremo opuesto del complejo hibridado utilizando cuentas G. Las eluciones se llevaron hasta una concentración final de 1X SSPE por medio de la adición de 50 µl de 3X SSPE/Tween 20 al 0,1% y se unieron a 30 µl de cuentas G (en Tween 20 al 0,1%) durante 15 min a temperatura ambiente con rotación. Las cuentas se lavaron a continuación como antes y se hicieron eluir en 30 µl de 0,1X SSPE/Tween-20 y se prepararon para la unión como se describe más abajo.

#### 14.3 UNIÓN, ESTIRAMIENTO, E INMOVILIZACIÓN

25 Las muestras se prepararon para la unión mediante adición de 1 µl de una dilución 1/5000 de microesferas fluorescentes Tetraspec<sup>®</sup> 0,1 µM (producto Núm. T7279, Molecular Probes). Las muestras se cargaron en un dispositivo fluido Nanostring y se anclaron a un portaobjetos Accer18 Optichem<sup>®</sup> recubierto con estreptavidina (Núm. de producto TB0200) inclinando el dispositivo 45 grados durante 15 min y se repitió un total de 4 veces. Después de la carga, la superficie del portaobjetos se lavó una vez con 90 µl de 1X TAE. Después de eliminar el  
30 tampón de lavado la muestra se prepara para el electroestiramiento por medio de la adición de 40 µl de TAE a cada pocillo. Los complejos anclados se extendieron aplicando 200 V a través del canal fluido. Al cabo de 1 minuto las muestras se inmovilizaron en la posición estirada añadiendo 60 µl de la solución de oligos del gancho G 500 nM al pocillo que contenía el electrodo cargado negativamente mientras se continuaba aplicando voltaje durante 5 minutos. Después de la inmovilización la solución de TAE se retiró y se reemplazó por reactivo anti-  
35 fotoblanqueamiento para la formación de imágenes.

#### 14.4 FORMACIÓN DE IMÁGENES

40 Se tomaron imágenes de los portaobjetos en Nikon Eclipse TE2000E equipado con una fuente de luz de haluro metálico (X-cite 120, Exfo Corporation) y una lente para aceite de inmersión 60X (Plan Apo VC, Nikon AN de 1,4). Para cada campo de visión, se tomaron 4 imágenes a diferentes longitudes de onda de excitación (480, 545, 580 y 622) con una cámara Orca Ag CCD (Hamamatsu) bajo el control de Metamorph (Universal Imaging Corporation) o programas diseñados expresamente para tal fin. Las imágenes fueron tratadas con programas para el tratamiento de imágenes diseñados expresamente para tal fin.

#### 14.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

45 Los datos primarios se extrajeron de las imágenes tratadas utilizando programas diseñados expresamente para tal fin. Los datos se normalizaron a los recuentos medios para las aplicaciones de control en cada muestra. Para determinar si un gen era "detectado" por el sistema, los recuentos obtenidos para cada gen a partir de hibridaciones que contenían ARN se compararon con los recuentos medios de dos controles negativos utilizando un ensayo de la t de Student. El número de genes detectados fue de 441 (87%) y 445 (88%) en la muestra Núm.1 y Núm. 2, respectivamente.

50 Un gráfico de dispersión (la Figura muestra valores de la señal log<sub>2</sub> normalizados y promedio para cada muestra positiva (n=3) para los 509 genes. Los genes que fueron significativamente diferentes en las dos muestras se

5 identificaron por medio de un ensayo de la T de los valores señal en la muestra Núm. 2 frente a la muestra Núm. 1. En el gráfico de más abajo, las líneas continuas indican el umbral regulado al alza 2 veces (línea de color negro) y el umbral regulado a la baja 2 veces (línea de color gris) con respecto a la muestra Núm. 1. Los genes con cambios de veces significativos (valor de  $p < 0,05$ ) se muestran con diamantes rellenos de color negro. Los genes cuyos valores de p de cambio de veces fueron inferiores a este umbral se muestran en cuadrados de color negro vacíos.

### 15. EJEMPLO 10: DETECCIÓN DE PEQUEÑAS MANCHAS

10 Como se ha mencionado anteriormente, las regiones de anclaje a la marca de una región del armazón del nanoinformador tienen una longitud de 10 nm a 10000 nm, pero preferiblemente se corresponden íntimamente con la mancha más pequeña que se pueda detectar con una óptica convencional, que es de alrededor de 300 nm. Las manchas de diferentes colores (distinguidas espectralmente) se pueden resolver espacialmente a espaciamientos más cercanos que las manchas del mismo color. Es posible colocar una, dos, tres o cuatro manchas de diferentes colores entre dos manchas del mismo color, y resolver aún espectralmente y espacialmente todas las manchas. También es posible reducir significativamente la distancia entre dos manchas del mismo color.

15 A menudo se piensa en los límites de resolución espacial, es decir, que diferencian manchas estrechamente espaciadas del mismo color, como límites difíciles, esto es, los Criterios de Rayleigh (Inoue, S., Spring, Video Microscopy (Plenum Press, 1997), pág. 30). Existen muchas técnicas para ir más allá de estos límites que implican técnicas de formación de imágenes y/o tratamiento de imágenes diferentes. Por la parte de la formación de imágenes, la iluminación estructurada es un método para resolver manchas del mismo color que están espaciadas más cercanas juntas. Se ha demostrado 50 nm pero, en teoría, la resolución con iluminación estructurada es ilimitada (Gustafsson, 2005, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 102:13081-13086). Por la parte del tratamiento de imágenes, el modelado de la mezcla es una técnica eficaz para ir más allá de los límites comúnmente aceptados (Thomann et al, 2002, J. Microsc. 211:230-248). La combinación de estas técnicas permite nanoinformadores drásticamente más pequeños con manchas más pequeñas, correspondiendo a regiones de anclaje a la marca de menos de 50 nm.

25 Estos menores espaciamientos de las manchas podrían permitir informadores drásticamente más pequeños y más estables, un mayor número de códigos, así como un mayor grado de multiplexado antes de sobrepasar el umbral de entrelazamiento (para una explicación de los umbrales de entrelazamiento, véase el ejemplo 9 (descrito en la Sección 14) anterior. La contrapartida de elaborar las manchas mucho más pequeña y los informadores mucho más cortos sería la disminución de la señal y tiempos de barrido más cortos. Sin embargo, otros avances técnicos, tales como, fuentes de luz más brillantes, y CCD más eficaces pueden compensar el aumento de los tiempos de barrido  
30 haciendo estos enfoques razonables.

**REIVINDICACIONES**

1. Un par de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda,

(a) siendo dicha primera sonda un complejo que comprende:

5 (i) una primera molécula que comprende una primera región de anclaje a la marca a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal y una segunda región de anclaje a la marca, que no es solapante con la primera región de anclaje a la marca, a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituyen una segunda señal;

(ii) una primera secuencia específica de la diana anclada a la primera molécula, y

(iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha primera molécula,

10 (b) siendo dicha segunda sonda una segunda molécula, que comprende

(i) una segunda secuencia específica de la diana;

(ii) opcionalmente, una tercera región de anclaje a la marca a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y

(iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha segunda molécula;

15 donde la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana se unen a regiones diferentes de la misma molécula diana,

donde la molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc,

20 donde cuando dicho par de sondas se une a su molécula diana, la identidad de la primera y segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica la molécula diana,

donde la primera, la segunda, y la tercera regiones de anclaje a la marca son secuencias de nucleótidos predeterminadas,

donde la primera, la segunda, y la tercera señales son distinguibles espacialmente, y

25 donde una primera molécula de ADN o ARN se hibrida a la primera región de anclaje a la marca, a cuya dicha primera molécula de ADN o ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una segunda molécula de ADN o ARN se hibrida a la segunda región de anclaje a la marca, a cuya dicha segunda molécula de ADN o ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

2. Un par de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda,

30 (a) siendo dicha primera sonda un complejo que comprende:

(i) una primera molécula que comprende una primera región de anclaje a la marca a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una primera señal y una segunda región de anclaje a la marca, que no es solapante con la primera región de anclaje a la marca, a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una segunda señal;

35 (ii) una primera secuencia específica de la diana anclada a la primera molécula, y

(iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha primera molécula,

(b) siendo dicha segunda sonda una segunda molécula, que comprende

(i) una segunda secuencia específica de la diana;

40 (ii) opcionalmente, una tercera región de anclaje a la marca a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y

(iii) una etiqueta de afinidad anclada a dicha segunda molécula;

donde la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana se unen a regiones diferentes de la misma molécula diana,



donde la primera señal, la segunda señal y la tercera señal son distinguibles espacialmente; donde la molécula diana es una molécula de origen natural o un ADNc de una molécula de origen natural o el complemento de dicho ADNc,

5 donde cuando dicho par de sondas se une a su molécula diana, la identidad de la primera y segunda señales y sus localizaciones relativas entre sí constituyen al menos parte de un código que identifica la molécula diana,

donde la primera, la segunda, y la tercera regiones de anclaje a la marca son secuencias de nucleótidos predeterminadas, y

10 donde una primera molécula de ADN o ARN se hibrida a la primera región de anclaje a la marca, a cuya dicha primera molécula de ADN o ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una segunda molécula de ADN o ARN se hibrida a la segunda región de anclaje a la marca, a cuya dicha segunda molécula de ADN o ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

15 3. El par de sondas de las reivindicaciones 1 o 2, donde se hibridan una pluralidad de primeras moléculas de ADN o ARN a la primera región de anclaje a la marca, a cuyas moléculas de ADN o ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha primera señal; y donde una pluralidad de segundas moléculas de ADN o ARN se hibridan a la segunda región de anclaje a la marca, a cuyas segundas moléculas de ADN o ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha segunda señal.

20 4. El par de sondas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la segunda sonda comprende una tercera región de anclaje a la marca a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal.

5. El par de sondas de la reivindicación 4, donde dicha tercera región de anclaje es una secuencia de nucleótidos predeterminada, y donde una tercera molécula de ARN se hibrida a la tercera región de anclaje a la marca, a cuya tercera molécula de ARN se anclan dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye dicha tercera señal.

25 6. El par de sondas de la reivindicación 5, donde cuando el par de sondas se une a su molécula diana, el código comprende la identidad de la primera señal, la segunda señal y la tercera señal y sus localizaciones relativas entre sí.

30 7. El par de sondas de las reivindicaciones 1 o 2, donde el código comprende la identidad de la primera y segunda señales, sus localizaciones relativas entre sí, y el tamaño de la mancha resultante de al menos una de dichas señales.

8. El par de sondas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la primera y la segunda moléculas son moléculas de ácido nucleico.

9. El par de sondas de la reivindicación 8, donde las regiones de anclaje a la marca y las secuencias específicas de la diana son secuencias de nucleótidos predeterminadas.

35 10. El par de sondas de la reivindicación 9, en el que dichos uno o más monómeros marcadores se anclan covalentemente a los ácidos nucleicos hibridados a sus respectivas regiones de anclaje.

11. El par de sondas de la reivindicación 10, donde dichos ácidos nucleicos se hibridan a las respectivas regiones de anclaje por medio de uno o más ácidos nucleicos que forman puentes unidos no covalentemente.

40 12. El par de sondas de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la primera y la segunda secuencias específicas de la diana no están marcadas con uno o más cualesquiera de dichos monómeros marcadores.

13. El par de sondas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la segunda molécula comprende adicionalmente una cuarta región de anclaje a la marca, que no se solapa con la tercera región de anclaje a la marca, a la que se anclan uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una cuarta señal.

45 14. El par de sondas de la reivindicación 13, donde cuando el par de sondas se une a su molécula diana, el código comprende la identidad de la primera señal, la segunda señal, la tercera señal y la cuarta señal y sus localizaciones relativas entre sí.

50 15. El par de sondas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde una primera molécula de ARN se hibrida a la primera región de anclaje a la marca, a cuya primera molécula de ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituyen dicha primera señal; y donde una segunda molécula de ARN se hibrida a la segunda región de anclaje a la marca, a cuya segunda molécula de ARN se unen dichos uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituyen dicha segunda señal.

16. El par de sondas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las etiquetas de afinidad se anclan covalentemente a la primera molécula o a la segunda molécula.
17. El par de sondas de las reivindicaciones 1 o 2, donde los monómeros marcadores anclados a la primera región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye dicha primera señal, donde los monómeros marcadores anclados a la segunda región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la segunda señal y donde los monómeros marcadores anclados a la tercera región de anclaje a la marca, si estuvieran presentes, emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la tercera señal.
18. El par de sondas de las reivindicaciones 1 o 2, donde al menos una de la primera señal y la segunda señal comprende luz a una pluralidad de diferentes longitudes de onda.
19. El par de sondas de las reivindicaciones 1 o 2, donde la primera, la segunda y la tercera señales son espectralmente distinguibles.
20. El par de sondas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la primera y la segunda moléculas de ARN tienen cada una de 100 a 3.000 nucleótidos de longitud o donde la primera y la segunda moléculas de ARN tienen cada una de 500 a 1.500 nucleótidos de longitud.
21. El par de sondas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la segunda sonda es un complejo de ácido nucleico que comprende:
- (a) la segunda molécula, donde la segunda molécula comprende una tercera región de anclaje a la marca a la cual se hibrida una tercera molécula de ARN, a cuya tercera molécula de ARN se unen uno o más monómeros marcadores que emiten luz que constituye una tercera señal; y
  - (b) la segunda secuencia específica de la diana anclada a la segunda molécula,
- donde el código comprende la identidad de la primera, la segunda y la tercera señales y sus localizaciones relativas entre sí.
22. El par de sondas de la reivindicación 21, donde los monómeros marcadores anclados a la primera región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye dicha primera señal; donde los monómeros marcadores anclados a la segunda región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la segunda señal; y donde los monómeros marcadores anclados a la tercera región de anclaje a la marca emiten luz a la misma longitud de onda, cuya luz constituye la tercera señal.
23. El par de sondas de la reivindicación 21, donde al menos una de la primera señal, la segunda señal y la tercera señal comprende luz a una pluralidad de diferentes longitudes de onda.
24. El par de sondas de la reivindicación 21, en el que la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana no están marcadas con uno cualquiera o más de dichos monómeros marcadores.
25. El par de sondas de la reivindicación 21, donde la primera, la segunda y la tercera señales son distinguibles espectralmente.
26. El par de sondas de la reivindicación 21, donde la primera y la tercera señales emiten a la misma o a las mismas longitudes de onda.
27. El par de sondas de la reivindicación 21, donde la etiqueta de afinidad se une covalentemente a la primera molécula.
28. El par de sondas de la reivindicación 21, donde la etiqueta de afinidad se une covalentemente a la segunda molécula.
29. El par de sondas de la reivindicación 21, donde la primera, la segunda y la tercera moléculas de ARN tienen cada una de 100 a 3.000 nucleótidos o donde la primera, la segunda y la tercera moléculas de ARN tienen cada una de 500 a 1.500 nucleótidos,
30. El par de sondas de las reivindicaciones 21-30, donde las moléculas de ARN comprenden una única región que comprende una base repetida regularmente.
31. El par de sondas de la reivindicación 30, donde la base repetida regularmente es uracilo modificado con aminoalilo.
32. Un método para la detección de una molécula diana en una muestra biomolecular que comprende:
- (i) poner en contacto dicha muestra con un par de sondas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-31 en condiciones que permitan la unión de la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana a la molécula diana y

(ii) detectar el código que identifica la molécula diana.

33. El método de la reivindicación 32, que comprende adicionalmente la cuantificación de la cantidad de dicha molécula diana en dicha muestra biomolecular.

5 34. El método de las reivindicaciones 32 o 33, donde la concentración de cada una de dichas primera y segunda secuencias específicas de la diana está en exceso de la concentración de dicha molécula diana.

35. El método de las reivindicaciones 32-34, que comprende adicionalmente la etapa de estiramiento del par de sondas unido y la molécula diana antes de la detección del código que identifica la molécula diana.

10 36. El método de la reivindicación 35, donde el estiramiento se realiza utilizando una técnica seleccionada del grupo que consiste en estiramiento por flujo, una técnica de menisco en retracción, electroestiramiento y constricción en el flujo de un líquido que contiene el nanoinformador junto con un campo eléctrico oscilante.

37. Un método de detección de una pluralidad de moléculas diana en una muestra biomolecular que comprende:

15 (i) poner en contacto dicha muestra con una población de pares de sondas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en condiciones que permitan la unión de la primera secuencia específica de la diana y la segunda secuencia específica de la diana de cada par de sondas a su molécula diana respectiva, donde cada par de sondas en dicha población cuando se une a su molécula diana respectiva está asociada a un código distinguible, y

(ii) detectar los códigos que identifican la pluralidad de moléculas diana.

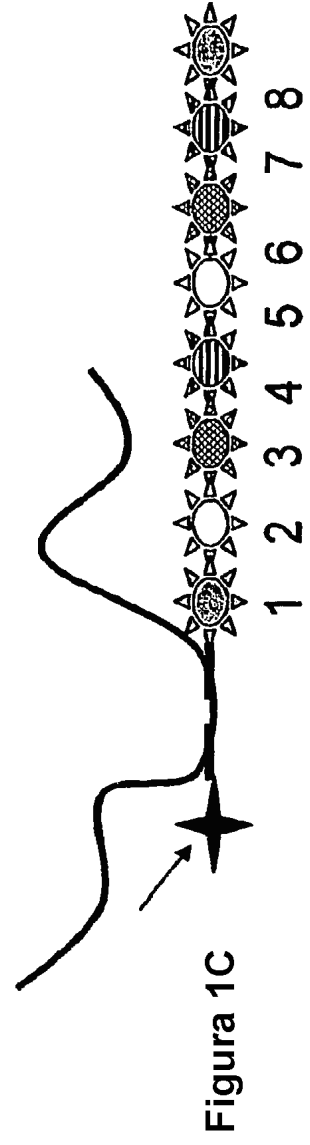
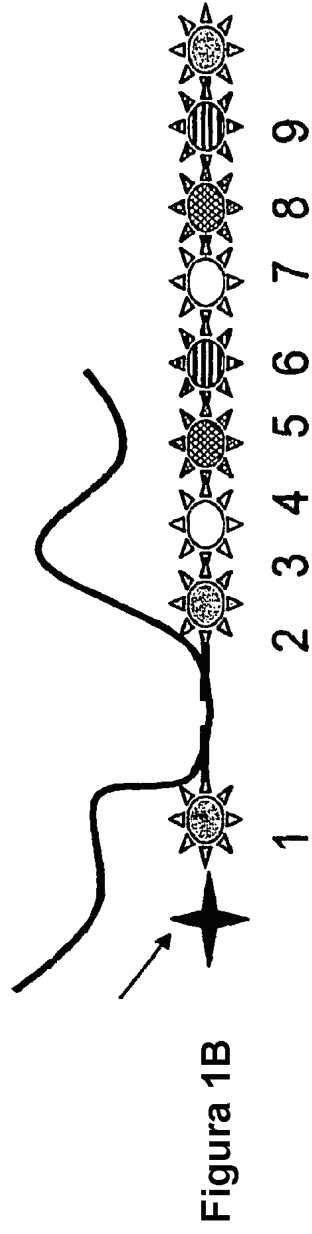
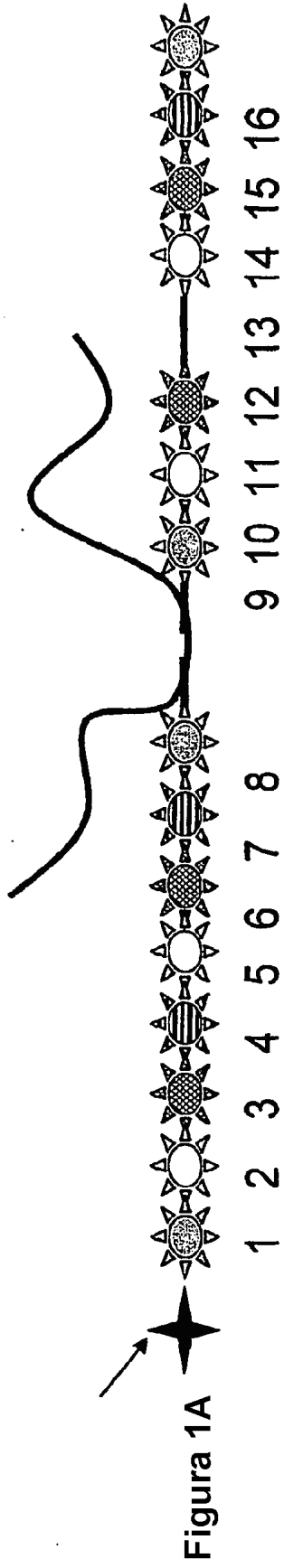
38. El método de la reivindicación 37, que comprende adicionalmente cuantificar la cantidad de cada una de dicha pluralidad de moléculas diana en dicha muestra biomolecular.

20 39. El método de las reivindicaciones 37-38, donde la concentración de cada una de dichas primera y segunda secuencias específicas de la diana de cada par de sondas de dicha población está en exceso de la concentración de su molécula diana respectiva.

25 40. El método de las reivindicaciones 37-39, que comprende adicionalmente la etapa de estiramiento de los pares de sondas unidos y sus moléculas diana respectivas antes de detectar los códigos que identifican la pluralidad de moléculas diana.

41. El método de la reivindicación 40, donde el estiramiento se realiza utilizando una técnica seleccionada del grupo que consiste en estiramiento por flujo, una técnica de menisco en retracción, electroestiramiento y constricción en el flujo de un líquido que contiene el nanoinformador junto con un campo eléctrico oscilante.

# FIGURA 1A-1C



# FIGURA 1D-1F

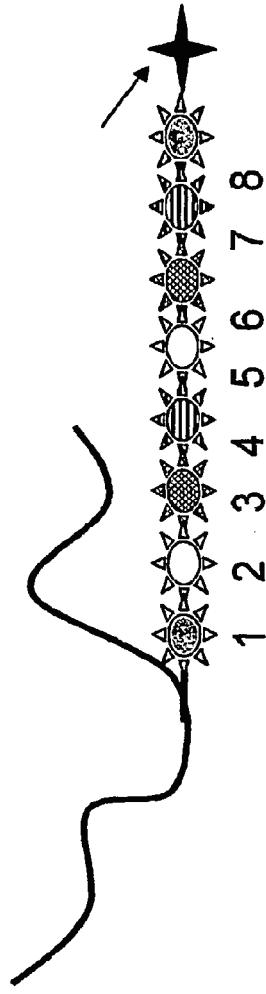


Figura 1D

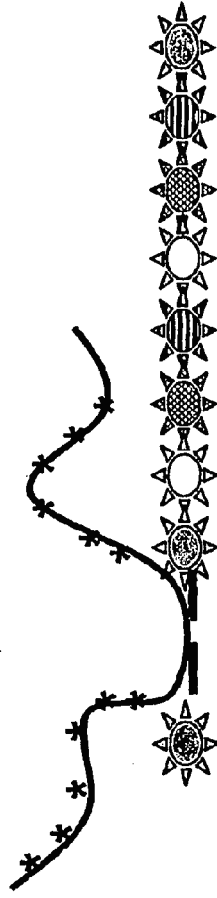


Figura 1E

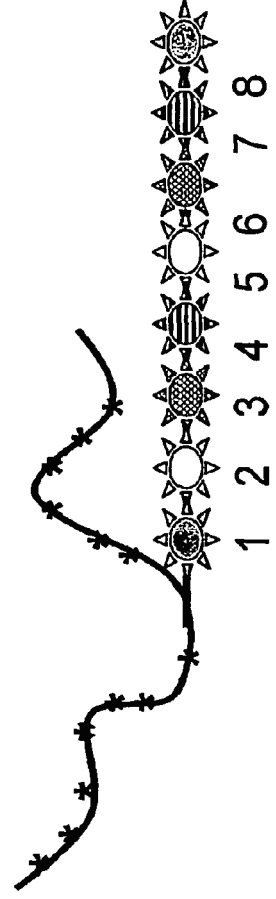


Figura 1F

# FIGURA 2

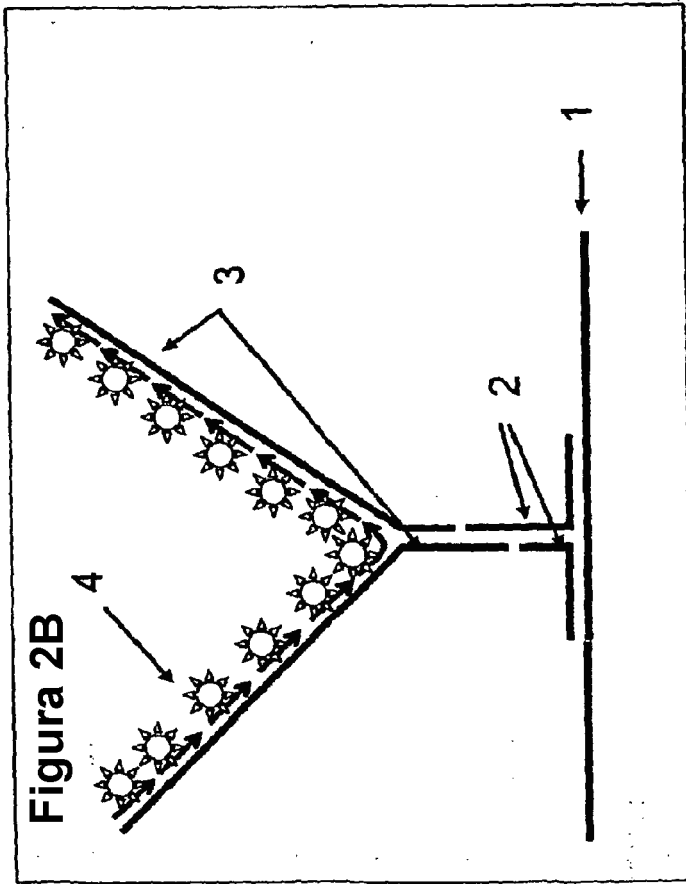


Figura 2C

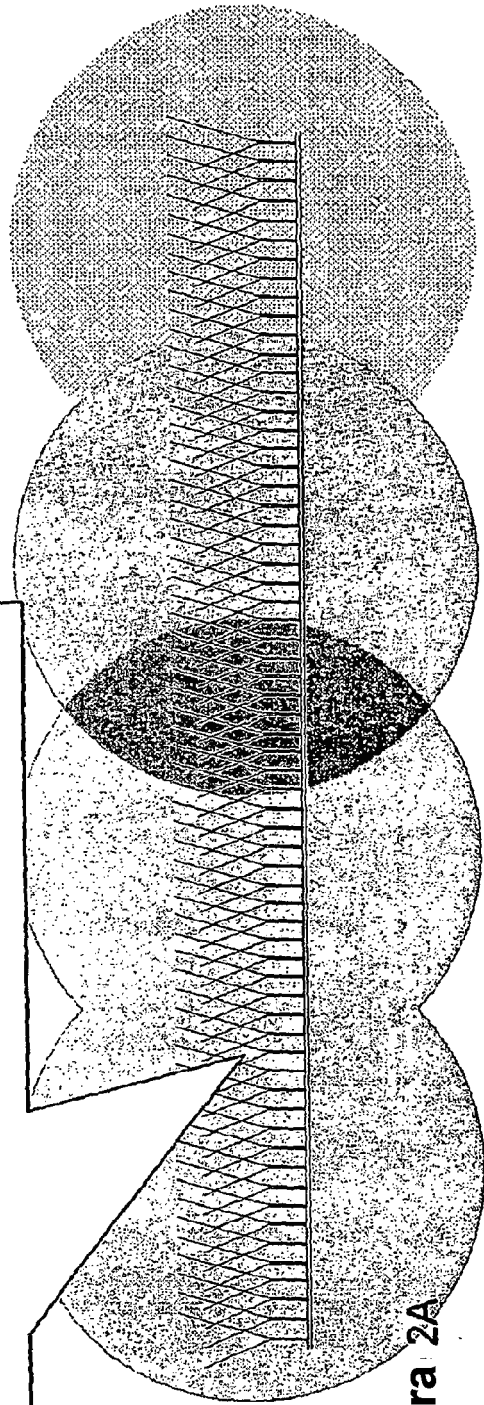


Figura 2A

# FIGURA 3

Figura 3A

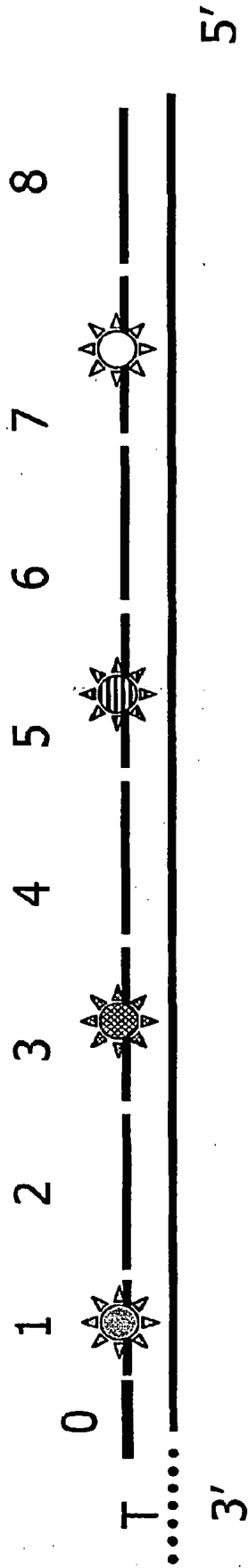
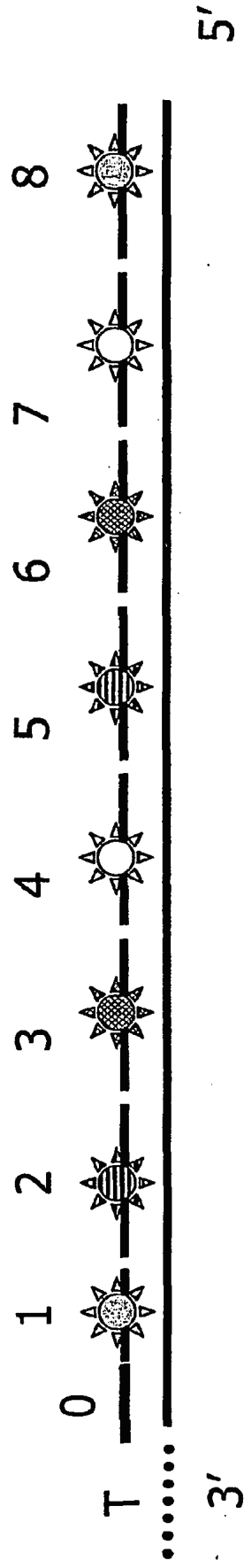
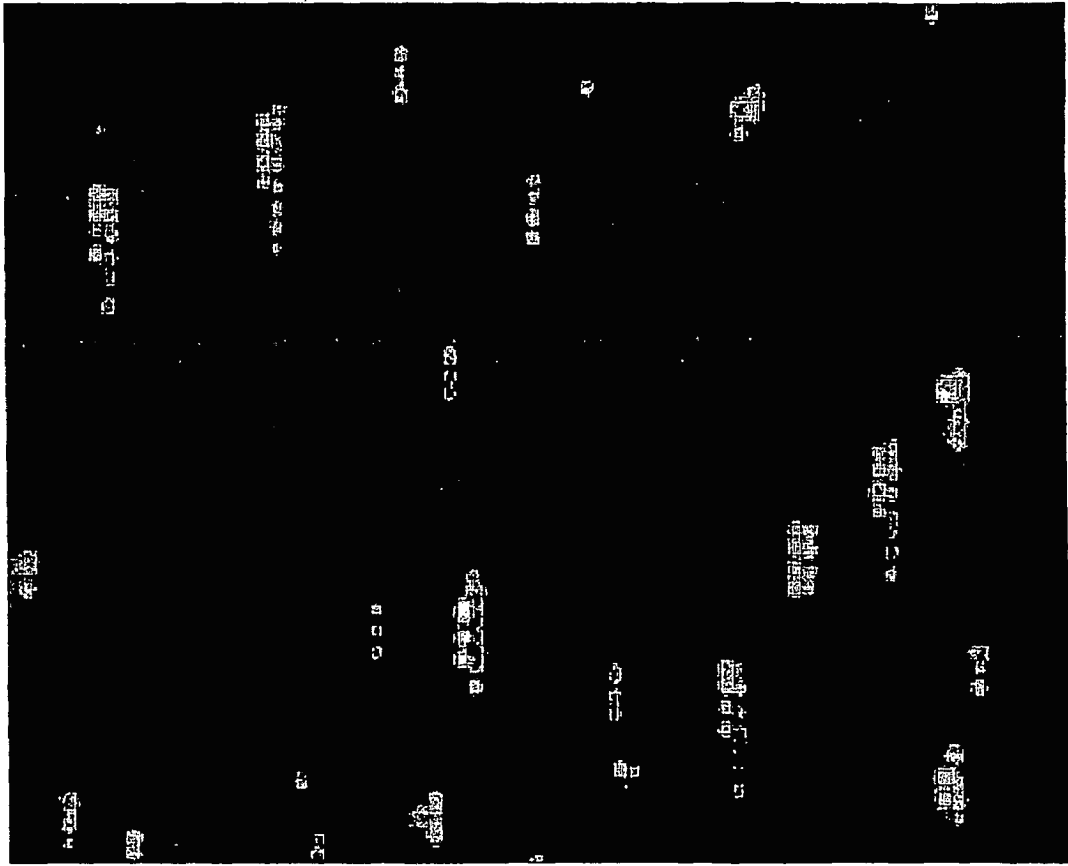


Figura 3B



# FIGURA 4





# FIGURA 5

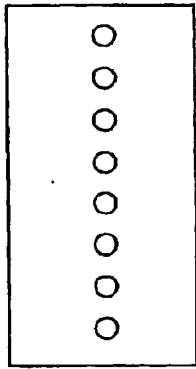


Figura 5A

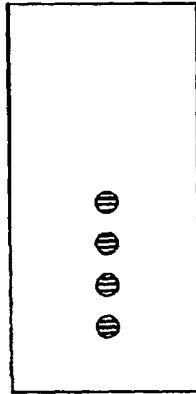


Figura 5B

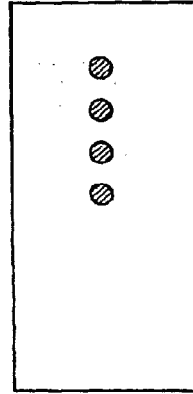


Figura 5C

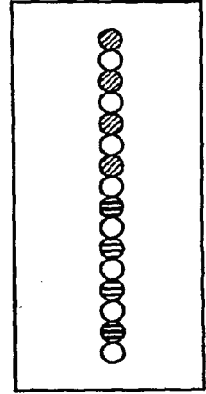
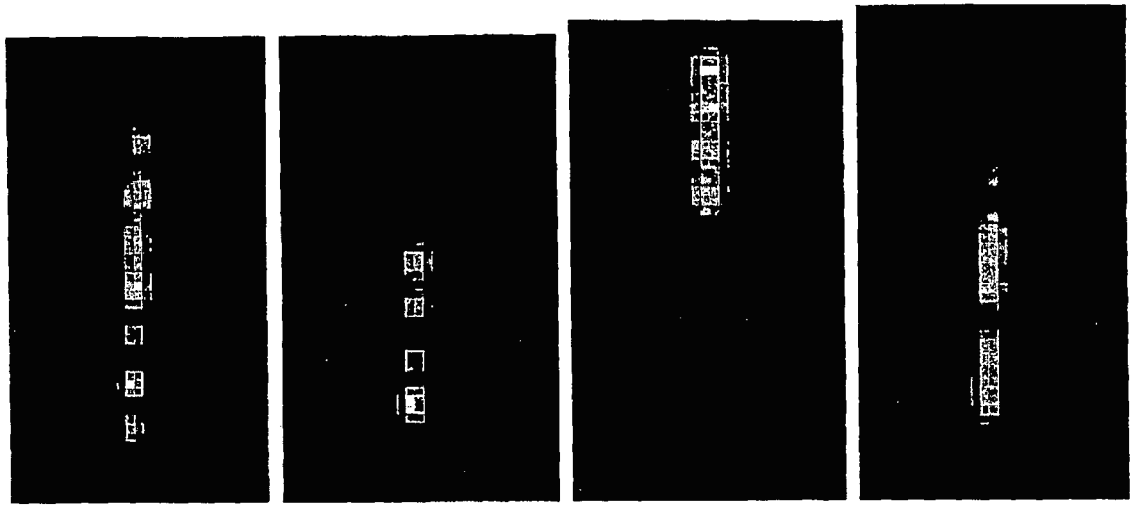


Figura 5D



# FIGURA 6

Figura 6A

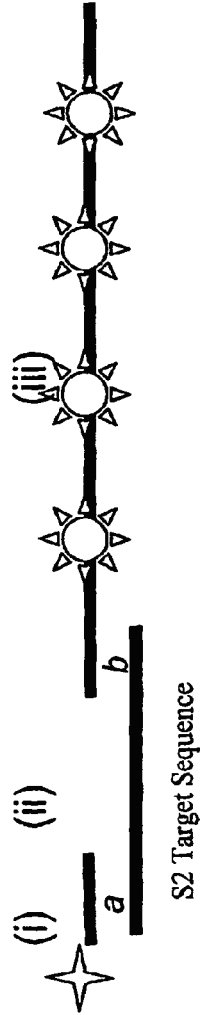


Figura 6E



Figura 6B

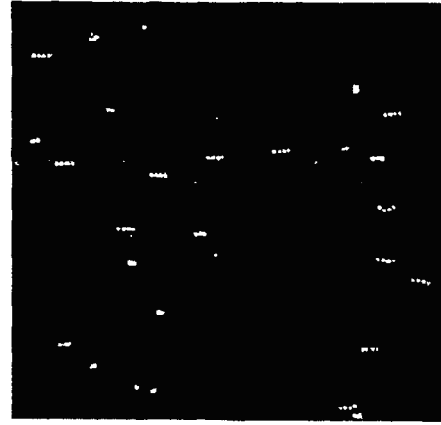


Figura 6C

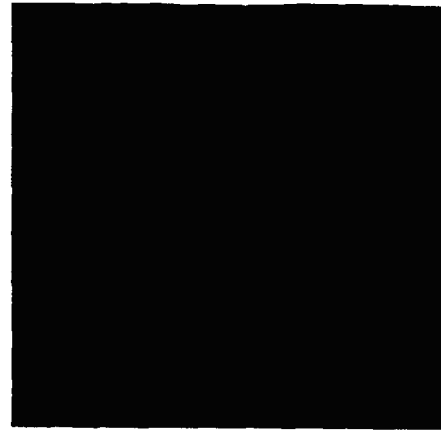


Figura 6D

**FIGURA 7A-D**

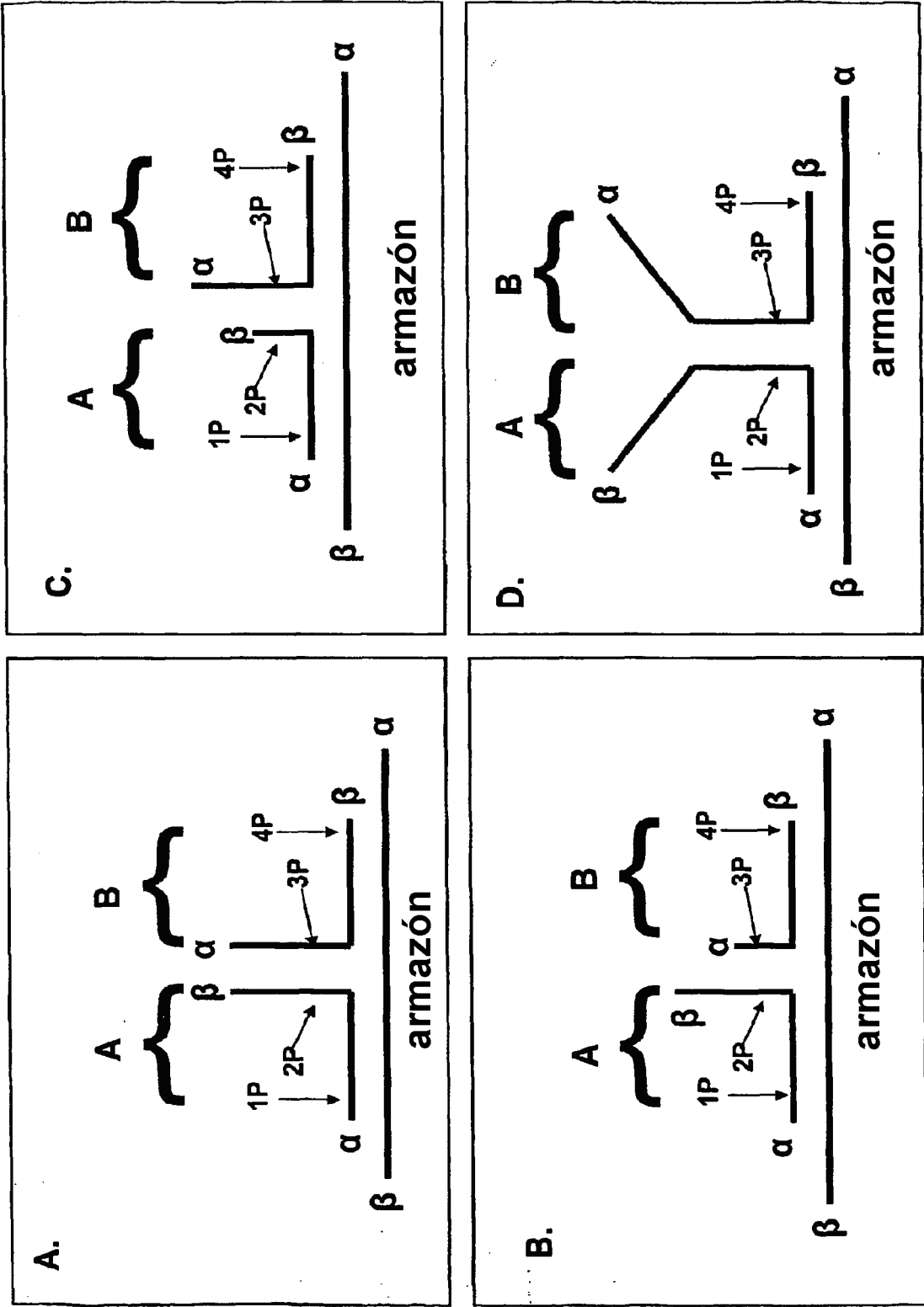
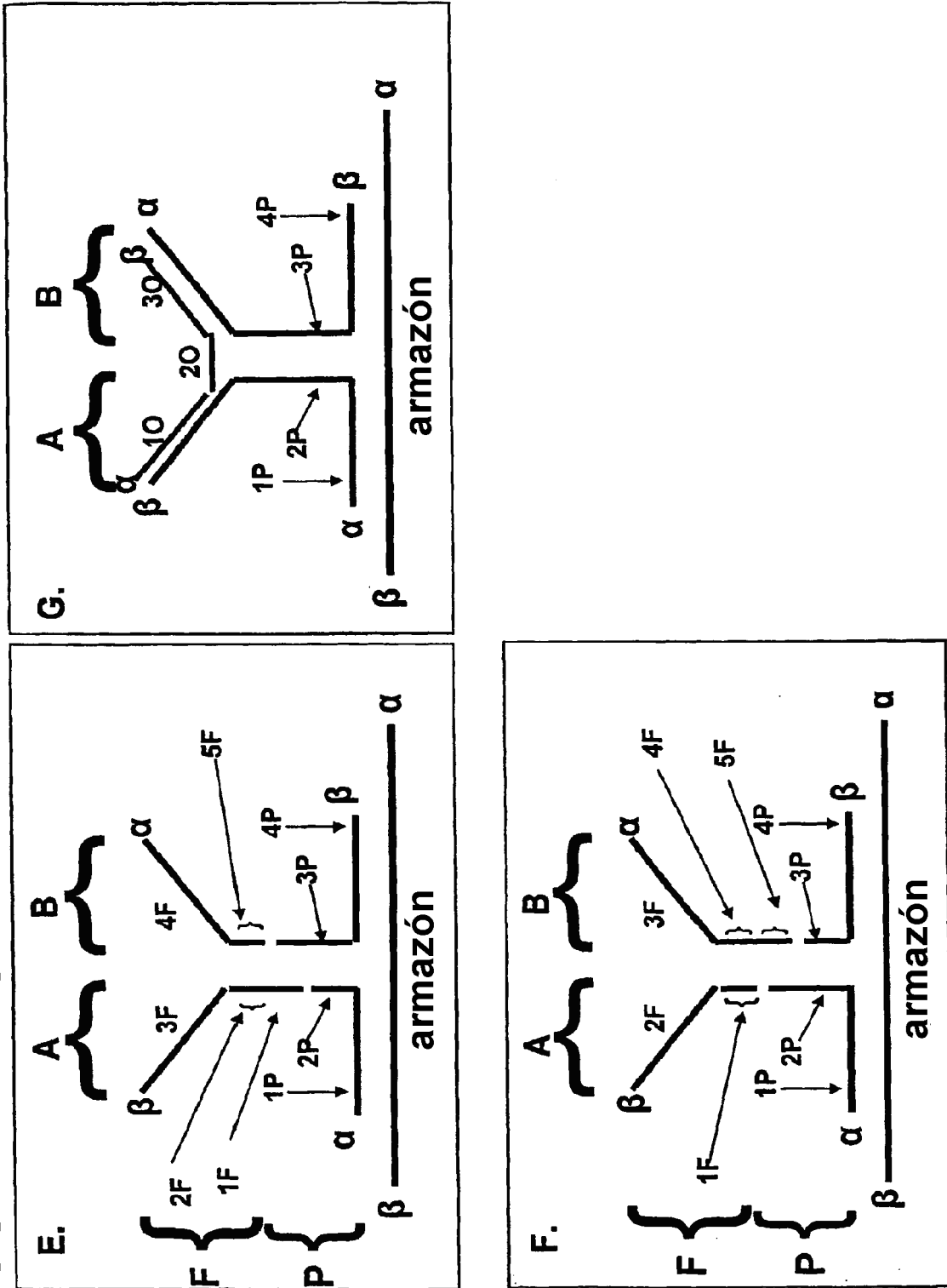
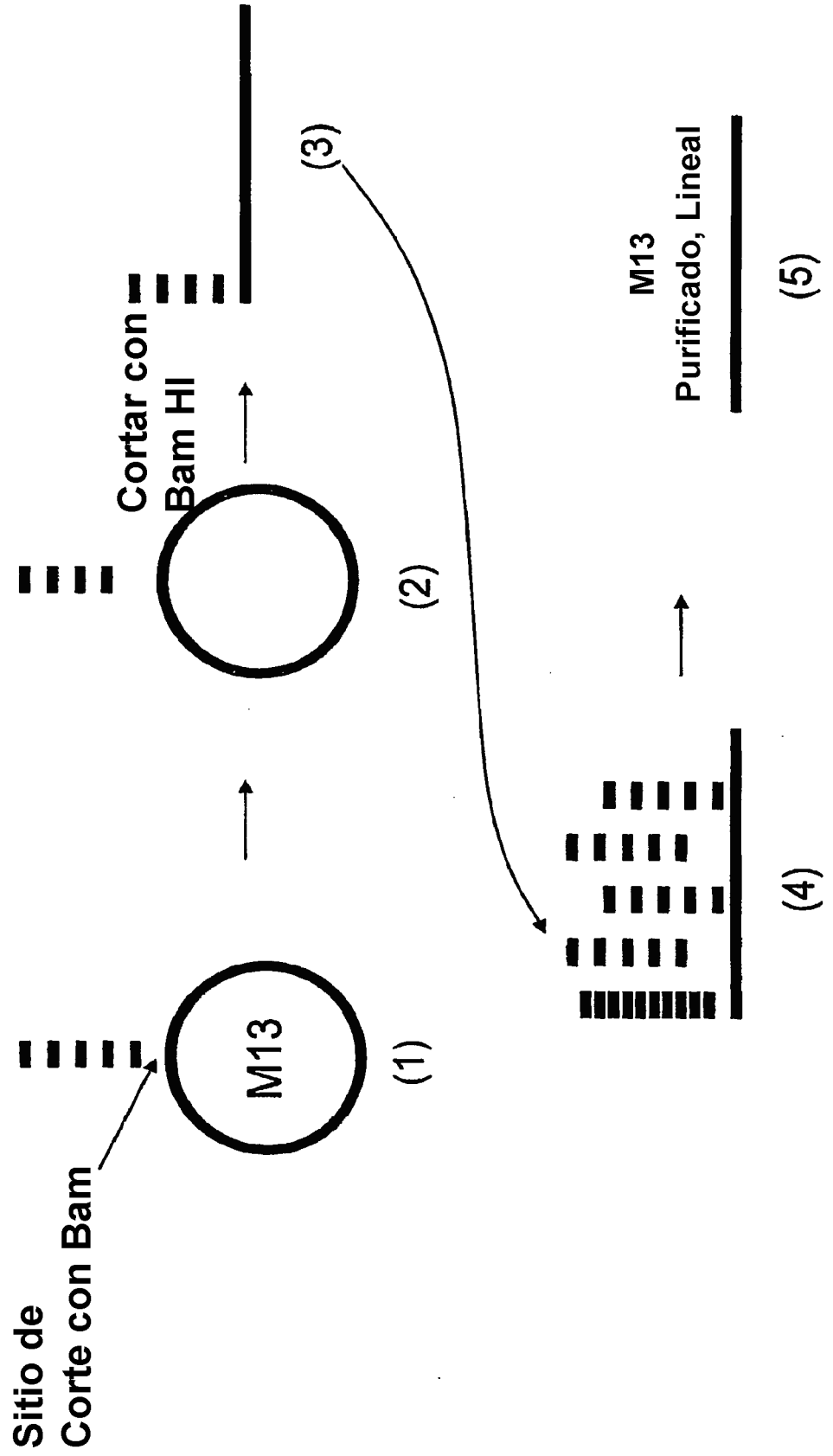


FIGURA 7E-7G



**FIGURA 8**



# FIGURA 9

Figura 9A

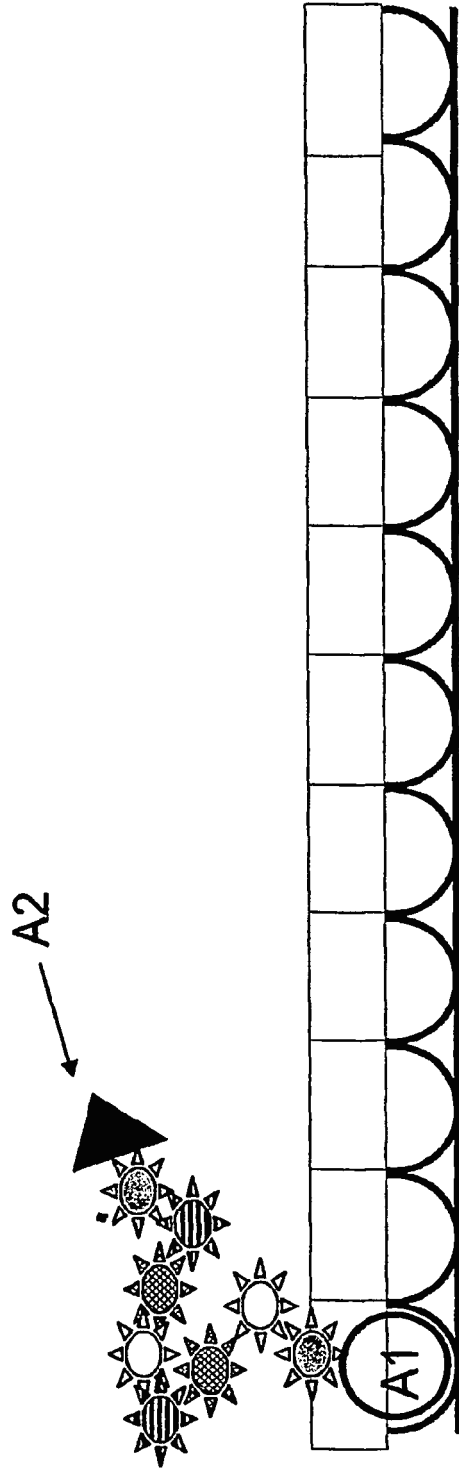
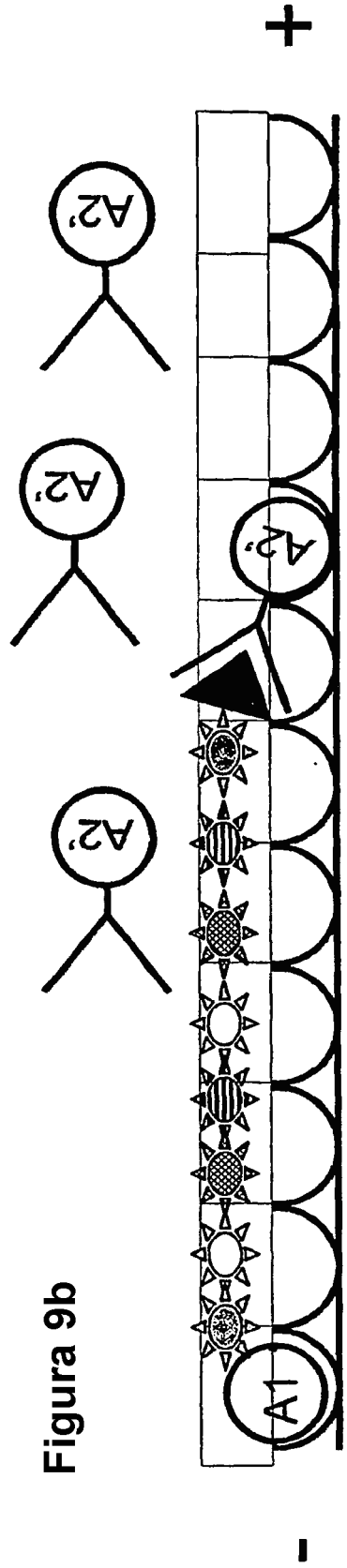


Figura 9b



# FIGURA 10

Figura 10A

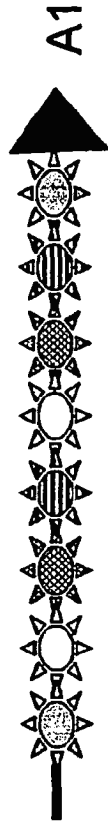


Figura 10B

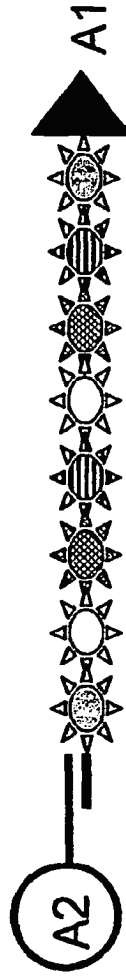
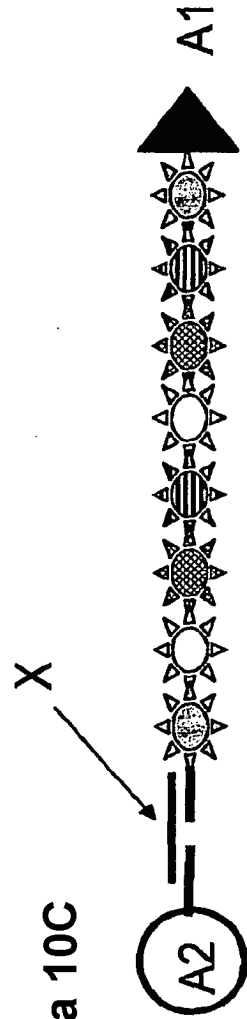


Figura 10C



# Figura 11

Figura 11A

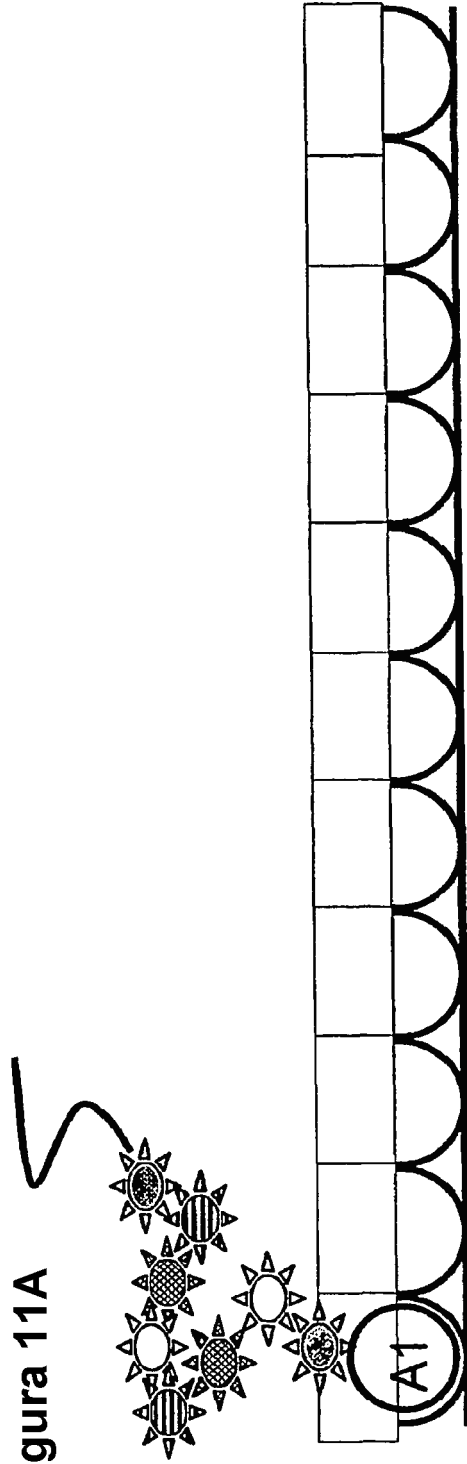
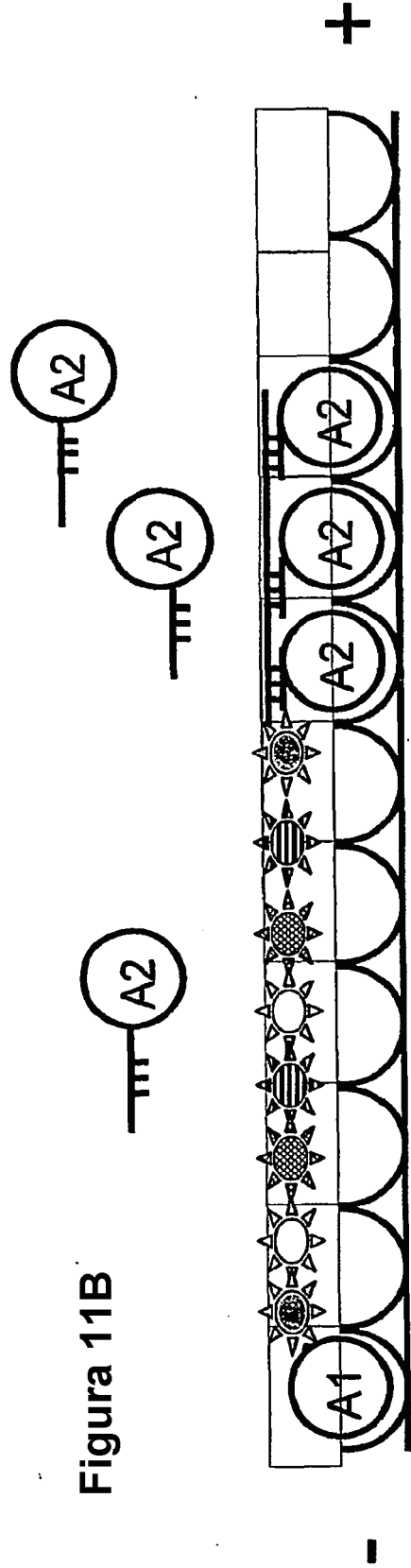


Figura 11B





# FIGURA 12A-12B

FIG. 12A

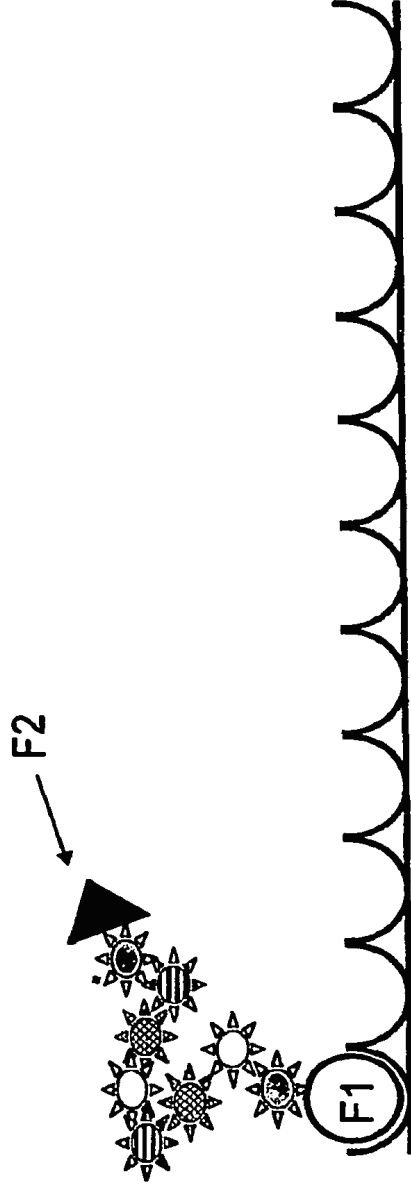
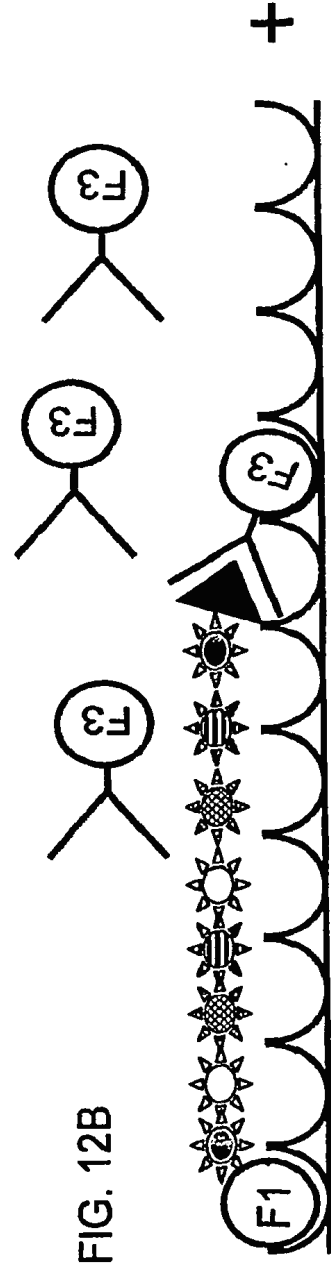
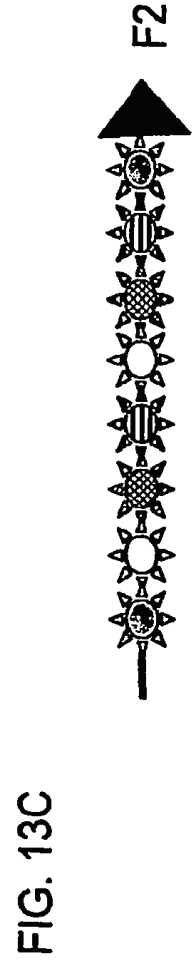
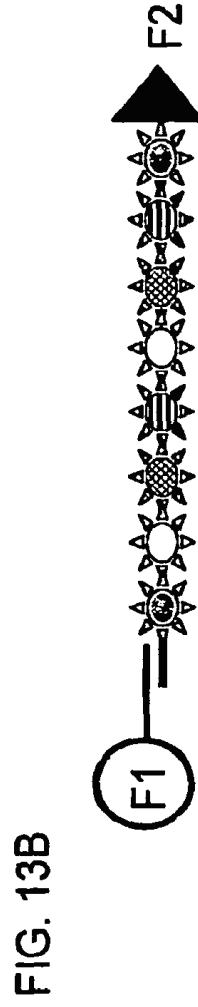
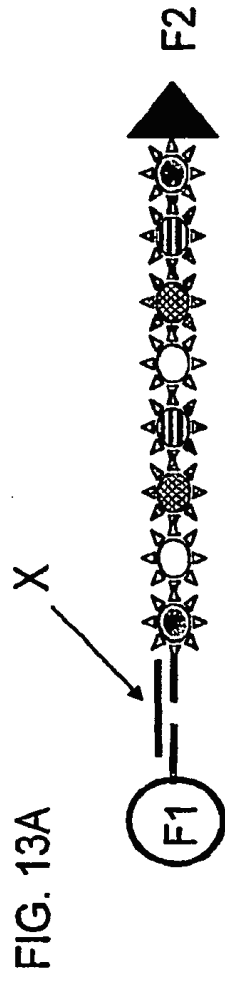


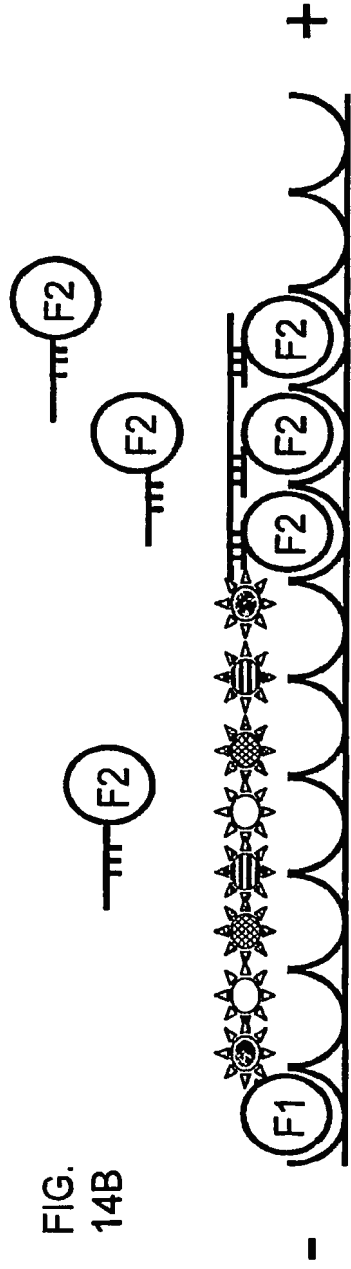
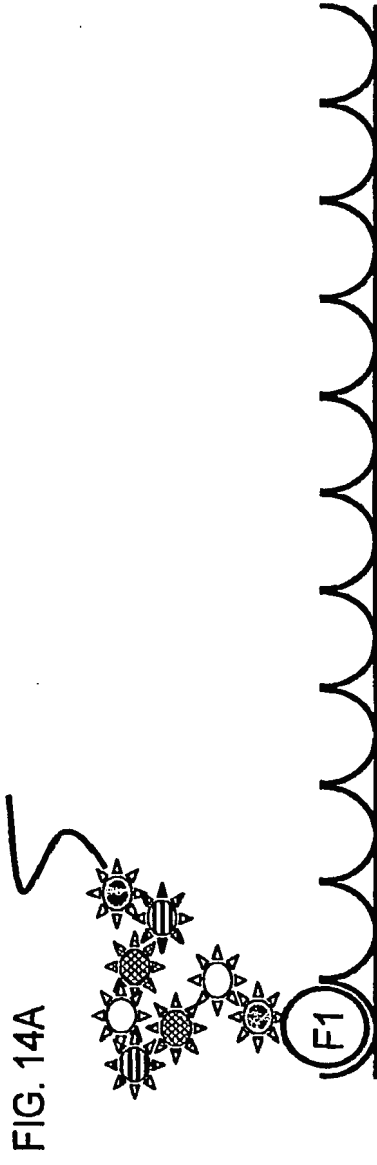
FIG. 12B



# FIGURA 13A-13C



# FIGURA 14A-14B



# FIGURA 14C-14D

FIG. 14C

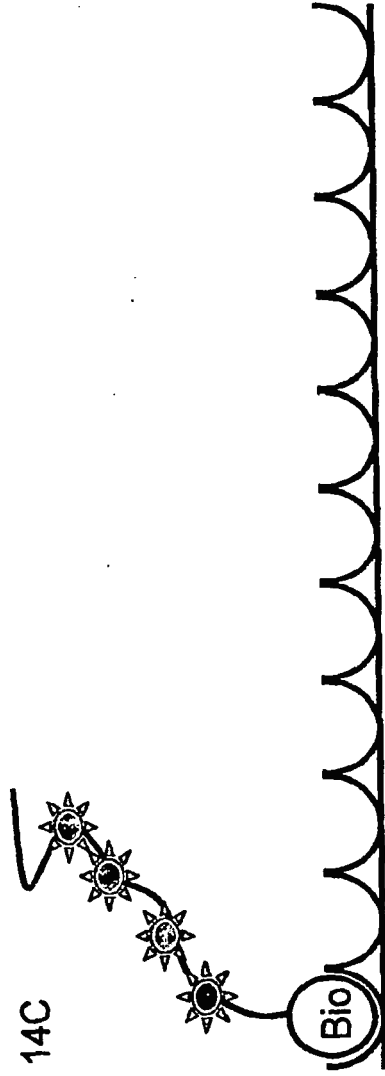
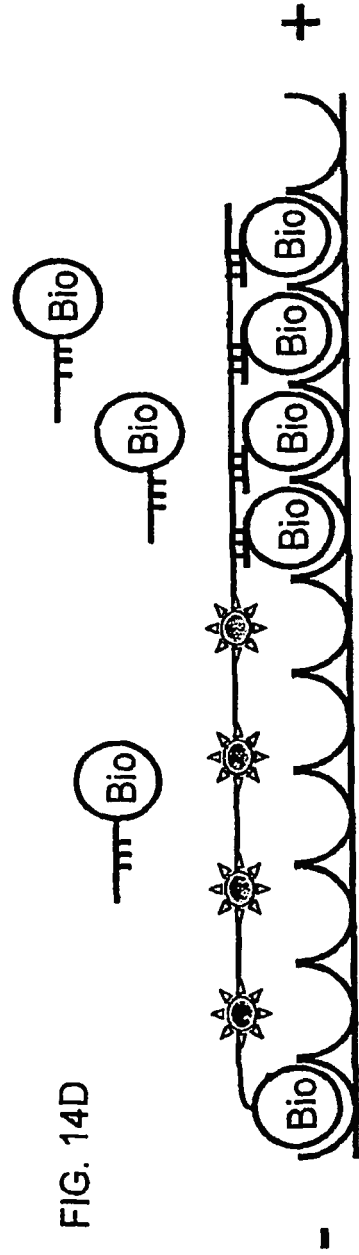


FIG. 14D



**FIGURA 15A**

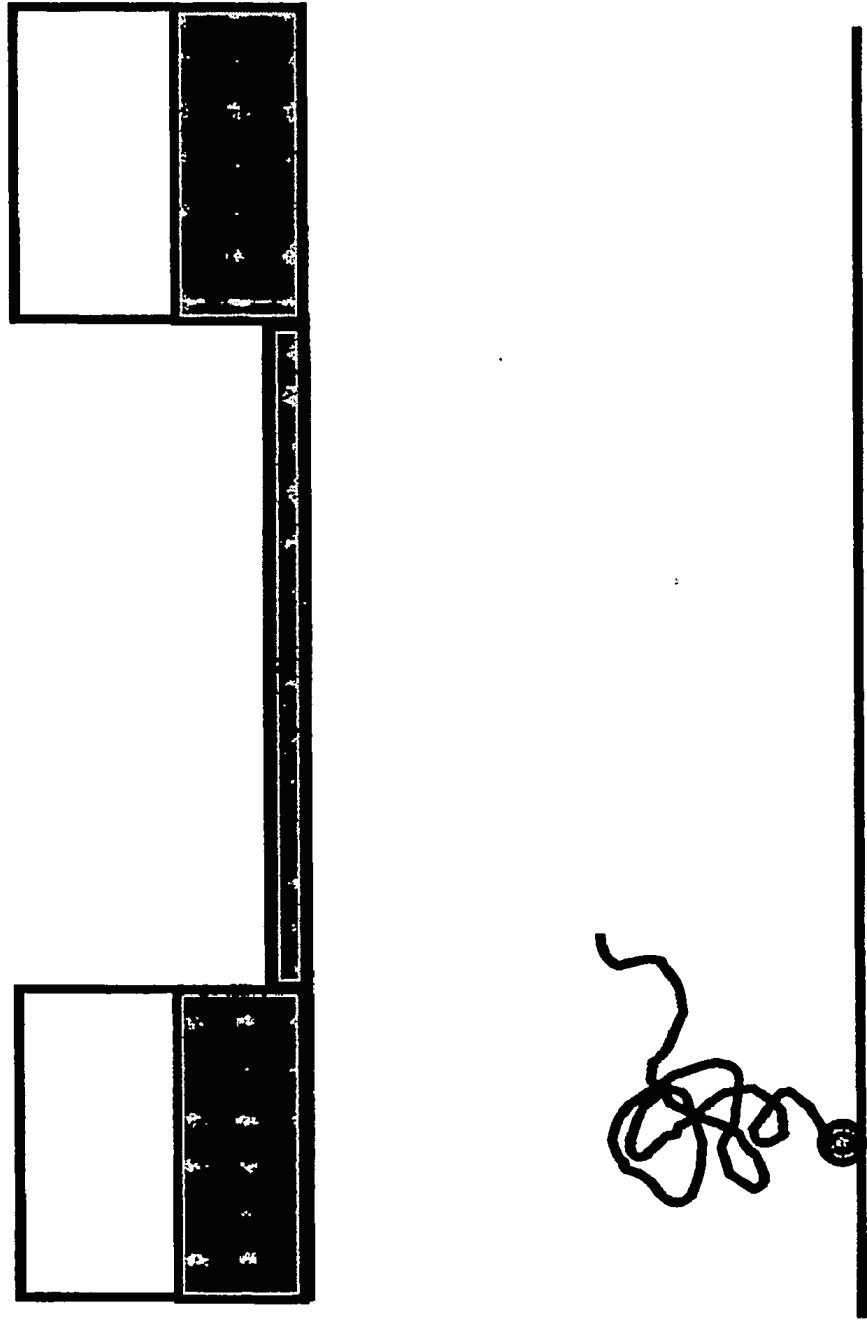


FIGURA 15B

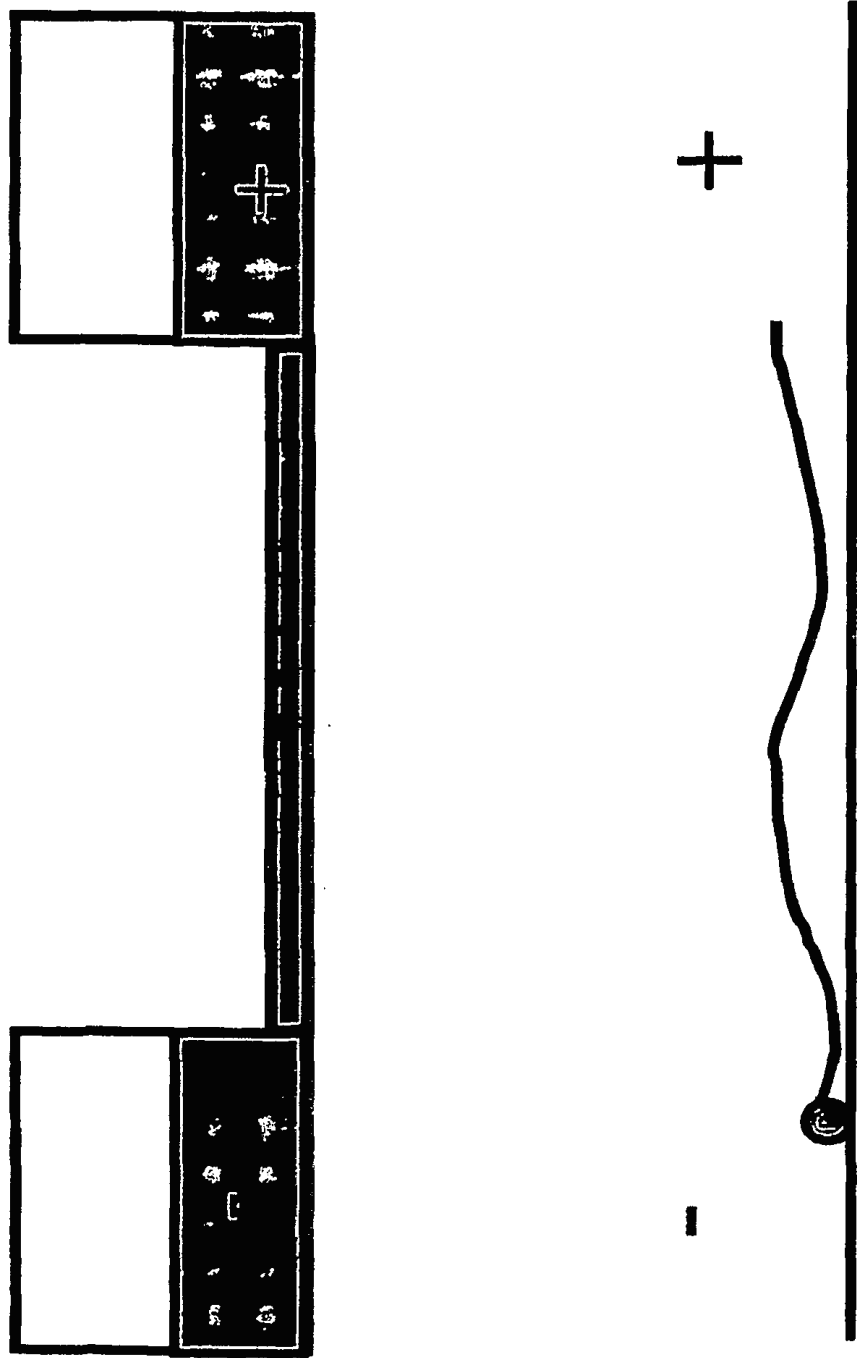
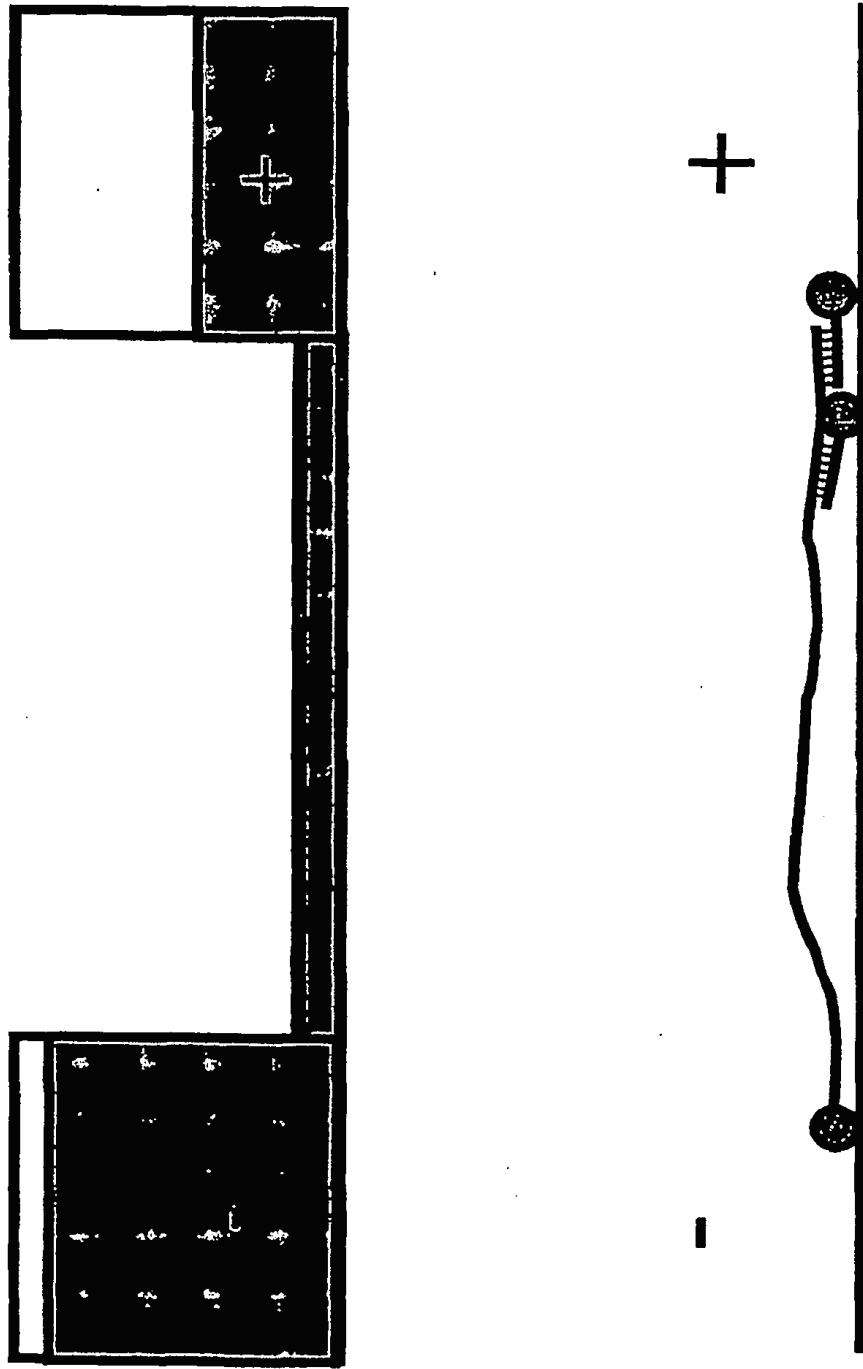


FIGURA 15C

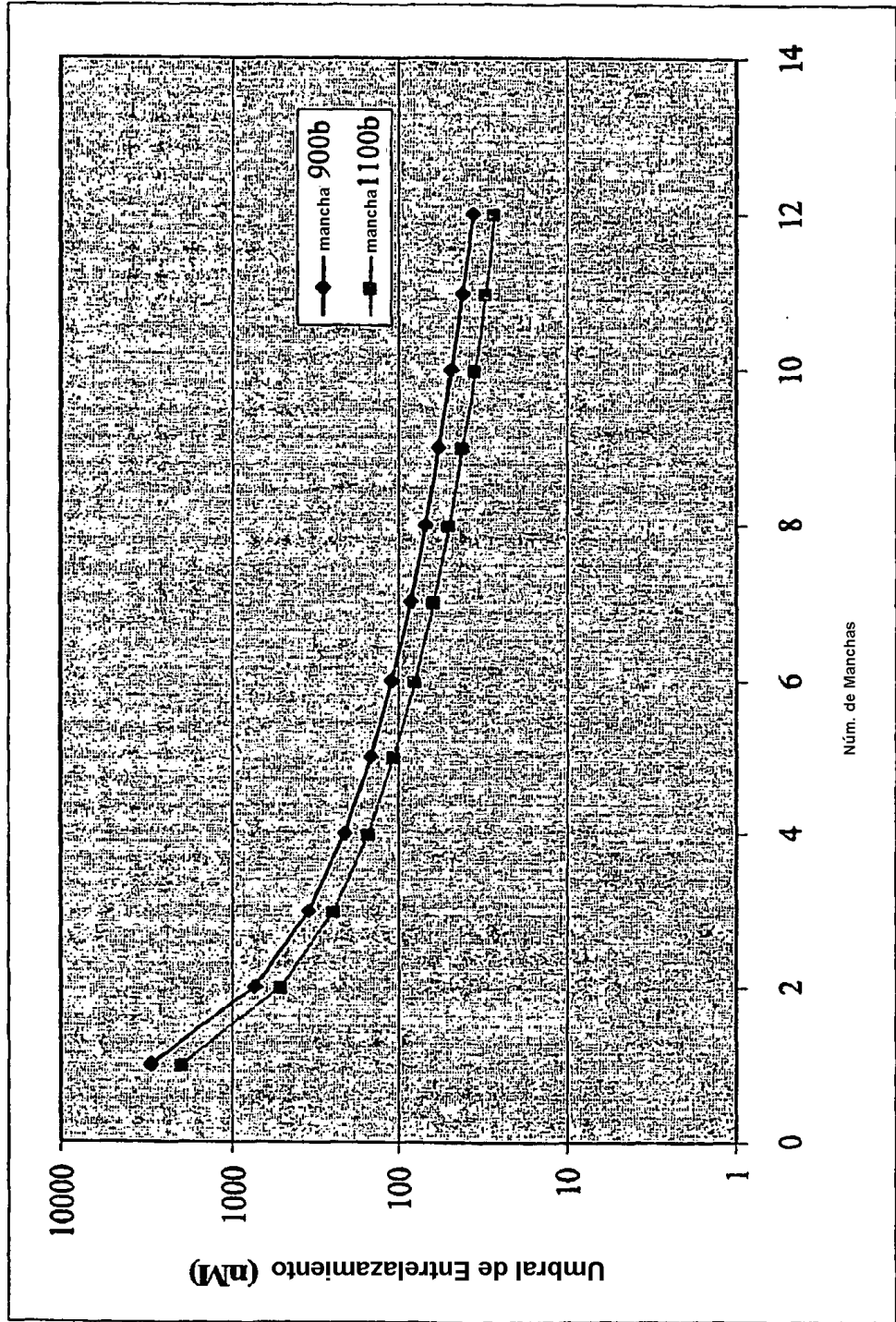




**FIGURA 16**



FIGURA 17



# FIGURA 18

