

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 734**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2005** **E 05857471 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 1766092**

54 Título: **Compómeros específicos de dianas y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

23.06.2004 US 874898

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

07.06.2013

73 Titular/es:

**SEQUENOM, INC. (100.0%)
3595 JOHN HOPKINS COURT
SAN DIEGO, CALIFORNIA 92121, US**

72 Inventor/es:

**EHRICH, MATHIAS y
VAN DEN BOOM, DIRK, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 406 734 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

Compómeros específicos de dianas y procedimientos de uso

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo del análisis químico, y concierne a composiciones y procedimientos para detectar biomoléculas diana concretas, incluyendo moléculas de ácido nucleico. En particular, la invención se refiere a composiciones y procedimientos que permiten la detección indirecta y el análisis de biomoléculas concretas, por ejemplo, mediante espectrometría de masas.

Antecedentes de la invención

1. Introducción.

- 10 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No es una admisión de que dicha información sea técnica anterior, o relevante, para las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación a la que se haga referencia de manera explícita o implícita sea técnica anterior.

2. Antecedentes

- 15 La detección y el análisis eficaces de alta fidelidad de biomoléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, y lípidos) constituyen un importante desafío en biología. Estos desafíos son especialmente importantes en el contexto del análisis de muestras biológicas, que por su naturaleza son extremadamente complejas, tanto en términos del número de las diferentes especies moleculares presente, como en lo que respecta a los números de moléculas de las diferentes especies particulares. Debido a esta complejidad, se requieren procedimientos muy sensibles y selectivos para generar resultados válidos y reproducibles. Otro aspecto que complica el problema es la necesidad de obtener estos resultados de una forma comercialmente viable, por ejemplo, en términos de coste, tiempo, etc.

- La importancia de abordar adecuadamente estos desafíos se considera mejor, quizás, en el contexto de la detección y el análisis a gran escala de ácidos nucleicos, que almacenan la información genética de todos los organismos vivos (por ejemplo, animales, plantas, y microorganismos). En resumen, la información genética está codificada por lo general en ácido desoxirribonucleico (ADN), aunque algunos virus contienen genomas hechos de ácido ribonucleico (ARN). En los seres humanos, un genoma haploide completo contiene aproximadamente trescientos mil nucleótidos, e incluye aproximadamente 35.000 genes repartidos en 24 cromosomas (veintidós cromosomas somáticos y dos cromosomas sexuales). Las moléculas de ADN y ARN naturales se sintetizan enzimáticamente como polímeros lineales de nucleótidos, que se diferencian entre sí solamente en términos de las bases incluidas en los nucleótidos particulares. En el ADN, se encuentran cuatro desoxirribonucleótidos diferentes, designados "A", "G", "C", y "T" debido a la inclusión de una base de adenina, guanina, citosina, o timina en el desoxirribonucleótido particular. Análogamente, el ARN contiene cuatro ribonucleótidos diferentes, designados "A", "G", "C", y "U" debido a la inclusión de cualquiera entre una de una base de adenina, guanina, citosina, o uracilo. En la naturaleza, el ADN es bicatenario de forma típica, en el que una de las hebras del ADN está hibridada con la otra de forma antiparalela, de acuerdo con el emparejamiento de bases Watson-Crick canónico, en el que la A de una hebra siempre se une mediante un enlace de hidrógeno con la T de la otra hebra, y en que G se empareja siempre con C. Las mismas reglas de emparejamiento de bases se aplican al ARN, excepto en que en el ARN, U sustituye a T y por tanto se empareja con A (tanto en el ADN como en el ARN).

- En la naturaleza, la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico particular no es aleatoria, y es esa secuencia de nucleótidos particular la que distingue un miembro de una especie de otro miembro de la misma especie, así como un gen de otro gen. En general, cada gen codifica una proteína específica, aunque algunos genes finalmente codifican proteínas diferentes debido a las diferencias en el corte y empalme de los ARN mensajeros transcritos para el mismo gen. En cualquier caso, una vez que un gen que codifica una proteína se ha expresado mediante la transcripción y la traducción, la proteína codificada tiene una función específica en una célula viva.

- Se sabe que, para un gen dado, o locus genético, pueden existir uno o más alelos. Los alelos de un gen dado se diferencian entre sí por diferencias en la secuencia de nucleótidos de cada alelo. Los alelos de un gen dado pueden surgir de la sustitución de un nucleótido por otro en una posición del nucleótido dada. Alternativamente, las diferencias entre alelos pueden ser debidas a la inserción o eliminación de uno o más nucleótidos en los diferentes alelos. Como resultado de estas diferencias en las regiones codificantes de proteína de un gen, las proteínas codificadas por los distintos alelos pueden diferenciarse por su tamaño y/o por su secuencia de aminoácidos. Con respecto a las proteínas que son enzimas, las diferencias en la secuencia de aminoácidos pueden dar por resultado diferencias en las velocidades catalíticas, especificidad de sustrato, necesidades de cofactores, estabilidad de la ubicación celular, pH óptimo, etc., parte de las cuales, o todas, pueden ser relevantes, por ejemplo, en el contexto de detección, prevención y tratamiento de enfermedades (por ejemplo, la adecuabilidad para administrar un fármaco concreto a un paciente en con interacciones fármaco/proteína específicas). Por otra parte, si la(s) diferencia(s) entre alelos es(son) poca(s) debido a cambios en la región reguladora del gen, el nivel de expresión de las proteínas codificadas por los alelos concretos puede diferir, incluso de forma importante.

Los cambios en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico genómico se produce como resultado de mutaciones en las que, durante la replicación y copia de un molde de ácido nucleico, no se obtiene como resultado una duplicación exacta del molde de ácido nucleico. Las mutaciones también pueden producirse durante la reparación del por ejemplo, de forma que una o ambas hebras del duplete de ADN se diferencian en su secuencia de nucleótidos cuando se comparan antes y después de una reacción de reparación. Como se ha indicado anteriormente, las mutaciones durante la replicación o la reparación incluyen la eliminación, inserción y/o sustitución de uno o más nucleótidos en una o ambas hebras del ADN bicatenario. Las mutaciones que implican la sustitución de un nucleótido por otro (por ejemplo, A por G) se han denominado mutaciones puntuales, ya que se han producido en la posición concreta de un nucleótido. En las regiones de codificación de proteína, una mutación puntual puede ser una mutación “de sentido incorrecto”, que da como resultado un cambio en el aminoácido codificado por el codón particular en el que se ha producido la mutación; una mutación “sin sentido”, en la que el cambio da como resultado que un codón cambia de uno que codifica un aminoácido a otro que codifica un codón de detención y por tanto conduce a una proteína truncada; o una mutación silenciosa, que da como resultado que el codón codifica el mismo aminoácido que antes. De nuevo, las mutaciones también se pueden suceder en las regiones no codificantes. Aunque este tipo de mutaciones no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen, puede afectar la regulación de la expresión del gen, la estabilidad de la molécula de ADN o de ARN, etc.

Si una mutación concreta persiste con el tiempo en una combinación de genes se determina por el proceso de selección natural, en el que los cambios que, con el tiempo mejoran la capacidad de supervivencia van a sobrevivir, mientras que los que no lo hacen desaparecen. Independientemente de los efectos evolutivos y que se han indicado anteriormente, las mutaciones pueden dar como resultado proteínas con actividades bioquímicas alteradas o, en algunos casos, incluso pérdidas, lo que a su vez puede producir una enfermedad, una reacción adversa a un fármaco concreto, etc. Análogamente, las mutaciones pueden producir una regulación aberrante de la expresión génica, lo que también puede conducir a una enfermedad, una alteración en la sensibilidad a un fármaco, etc. debido a la abundancia relativa, en exceso o en defecto, de uno o más productos génicos concretos.

Las enfermedades producidas por mutación, tanto heredadas o producidas en el ADN de un sujeto concreto, se denominan como ‘enfermedades genéticas’ o similar. Se conocen en la actualidad más de 4000 enfermedades resultado de diferencias alélicas, incluyendo hemofilias, talasemias, distrofia muscular de Duchenne (DMD), enfermedad de Huntington (EH), enfermedad de Alzheimer (EA), fibrosis quística (FQ) y anemia falciforme. Además de las enfermedades producidas por una mutación que da lugar a alelos asociados a enfermedad, las enfermedades genéticas también pueden estar causadas por importantes anomalías genéticas, tales como translocaciones, duplicaciones y eliminaciones de todo o parte de un cromosoma específico. Los ejemplos de dichas anomalías incluyen la Trisomía 21 (la causa del síndrome de Down) la Trisomía 13 (que origina el síndrome de Patau), la Trisomía 18 (que causa el síndrome de Edward), la Monosomía X (la causa del síndrome de Turner) y otras aneuploidías de los cromosomas sexuales tales como XXY (que causa el síndrome de Klinefelter). Además, se sabe que determinadas secuencias de por ejemplo predisponen a un individuo a cualquiera de numerosas enfermedades tales como diabetes, arteriosclerosis, obesidad, diferentes enfermedades autoinmunes, y cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal, de mama, de ovario, de pulmón y de próstata), y también puede predecir cómo un paciente va a responder a un fármaco concreto (es decir, si va a responder totalmente, y si lo hace, si la respuesta va a ser positiva o una reacción adversa.). Las diferencias genéticas también son relevantes en el campo del trasplante de órganos y tejidos, ya que si no se consigue “emparejar” el tipo de ALC (antígeno del leucocito humano), se puede producir el rechazo del órgano o tejido. Debido a la variación genética entre individuos de una especie dada, las secuencias de ADN pueden también servir como “huellas dactilares” para detectar o identificar diferentes individuos, evaluar la paternidad u otros aspectos de parentesco entre miembro de una especie, etc.

Dada la creciente importancia de los análisis del ácido nucleico en diferentes campos, se han desarrollado varios procedimientos para detectar y caracterizar el ADN. Por ejemplo, se pueden identificar secuencias de ácido nucleico comparando, mediante electroforesis en gel, la movilidad de un fragmento amplificado de ácido nucleico con la de un patrón conocido, o mediante hibridación con una sonda de oligonucleótido que sea complementaria de la secuencias a identificar. Sin embargo, la detección solamente se puede llevar a cabo si el fragmento de ácido nucleico está marcado con una función indicadora sensible (por ejemplo, una molécula que incluye un isótopo radioactivo (por ejemplo, ^3H , ^{32}P , o ^{35}S) o que es fluorescente o quimioluminiscente). Sin embargo, las etiquetas radioactivas pueden ser peligrosas, las señales que producen se desvanecen con el tiempo, y requieren procedimientos de eliminación especiales. Las etiquetas no isotópicas (por ejemplo, las etiquetas fluorescentes) tienen de forma típica una falta de sensibilidad y pérdida de señal, especialmente cuando se utilizan láseres de alta intensidad. Además, los procedimientos que implican electroforesis con etiquetado, y la posterior detección, son laboriosos, requieren tiempo y son propensos al error.

La espectrometría de masas, por otra parte, permite que las moléculas individuales (por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, y proteínas) se “ponderen” mediante la ionización de las moléculas en el vacío y haciéndolas “volar” mediante volatilización. Bajo la influencia de combinaciones de campos eléctricos y magnéticos, los iones siguen trayectorias dependientes de su masa (m) y carga (z) individuales. Durante mucho tiempo, la espectrometría de masas ha sido parte del repertorio físico-químico rutinario para análisis y caracterización de moléculas orgánicas de bajo peso molecular. Debido a las ventajas analíticas de la espectrometría de masas para proporcionar una elevada

sensibilidad de detección, la precisión en las medidas de masa, información estructural detallada, y su velocidad, así como la posibilidad de transferir los datos en línea a un ordenador, se ha dedicado un esfuerzo considerable al uso de la espectrometría de masas para el análisis estructural de ácidos nucleicos. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de los Estados Unidos con números 6.706.530; 6.635.452; 6.602.662; 6.589.485; 6.569.385; 6.566.055; 6.558.902; 6.468.748; 6.436.635; 6.428.955; 6.300.076; 6.277.573; 6.268.144; 6.268.131; 6.258.538; 6.235.478; 40 and 6.225.450. En la actualidad, se han desarrollado técnicas avanzadas para la ionización/desorción de muestras que contienen biomoléculas grandes como polinucleótidos, incluyendo electropulverización/pulverización de iones, y especialmente, la desorción/ionización de la matriz asistida por láser (MALDI). La espectrometría de masas MALDI utiliza habitualmente una configuración de tiempo de vuelo (TOF) para analizar la masa.

Otra ventaja clave que ofrece la espectrometría de masas es que proporciona una importante capacidad multiplex, es decir, que permite que muchas moléculas diferentes se distingan de una forma específica y sensible en un único análisis. Se han descrito recientemente sistemas que usan moléculas marcadores liberables no volátiles que contienen etiquetas de masa liberable. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos nº 6.635.452. En dichos sistemas, una o más etiquetas de masa liberable no volátiles específicas cada una de para dirigirse a un ácido nucleico particular, se liberan desde las moléculas sonda que se hibridan específicamente con una secuencia de nucleótidos particular. De esta forma, la detección mediante espectrometría de masas de una etiqueta con masa específica proporciona una detección indirecta de la molécula diana correlacionada con la etiqueta de masa específica. Gracias a la sensibilidad conseguida mediante la espectrometría de masas, se pueden usar en una única reacción multiplexada decenas, cientos, e incluso miles de diferentes especies de sonda teniendo cada una de ellas una etiqueta de masa liberable específica. Dichos sistemas, sin embargo, requieren la liberación de etiquetas de masa detectables y no volátiles desde las sondas. De esta forma, sigue existiendo una oportunidad para desarrollar otros sistemas, quizás más eficaces, que permitan la detección simultánea de un elevado número de diferentes biomoléculas diana (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico y/o proteínas) en una muestra biológica. Esto permitirá el análisis sistemático a gran escala de múltiples moléculas diana con propiedades y/o funciones predeterminadas.

3. Definiciones.

Antes de describir con más detalle la presente invención, se definirán algunos términos usados en el contexto de la presente invención. Además de estos términos, otros se han definido en la memoria, según necesidad. Salvo que se haya definido expresamente de otra forma en el presente documento, los términos de la técnica usados en la memoria tendrán su significado reconocido en la técnica.

El término "alelo" o "variante alélica" se refiere a formas alternativas de un gen concreto, y por tanto que ocupa el mismo locus o posición en cromosomas homólogos o en el ADN extracromosómico. Cuando un sujeto que tiene un genoma diploide tiene dos alelos idénticos de un gen, se dice que el sujeto es homocigótico para el gen o alelo. Cuando un sujeto tiene dos alelos diferentes de un gen, se dice que el sujeto es heterocigótico para el gen. Los alelos de un gen concreto pueden diferir entre sí en uno o más nucleótidos, tanto o simultáneamente en términos del número de nucleótidos y/o de identidad del nucleótido, ya que las posiciones específicas del nucleótido son el resultado de, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de nucleótidos. Por tanto, un alelo puede ser también un mutante de un gen.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a cualquier aminoácido modificado que se pueda sintetizar o, alternativamente, obtener de una fuente natural.

Un "amplicón" es una molécula de ácido nucleico generada en una reacción de amplificación del ácido nucleico, y que se ha derivado de un ácido nucleico diana. Un amplicón contiene una secuencia de un ácido nucleico diana que puede tener el mismo sentido, o un sentido opuesto, al del ácido nucleico diana. Un amplicón también puede contener secuencias no presentes en los ácidos nucleicos de los que se ha derivado el amplicón.

Un "cebador de amplificación" o "cebador" significa un oligonucleótido capaz de hibridarse con un sitio de unión al cebador (es decir, una secuencia de nucleobases complementaria de la secuencia base del cebador), y que actúa como un cebador y/o modelo del promotor (por ejemplo, para la síntesis de una hebra complementaria, formando de esta forma una secuencia promotora funcional) para iniciar la síntesis de ácido nucleico. Si el cebador está diseñado para también codificar una secuencia para iniciar la síntesis de ARN (por ejemplo, un promotor), esto se denomina un "promotor-cebador," y preferiblemente contiene, además de una región para hibridarse a un sitio de unión al cebador, una secuencia de bases que es no complementaria del ácido nucleico diana, pero que es reconocida por una ARN polimerasa tal como la ARN polimerasa T7, T3, o SPB. Un cebador de amplificación puede contener un extremo 3' que se ha modificado para evitar o disminuir la velocidad de extensión del cebador (véase, por ejemplo, La patente de los Estados Unidos nº 5.766.849). Preferiblemente, se usan dos o más cebadores diferentes en los procesos de amplificación. Un cebador "universal" se refiere a un cebador diseñado para hibridarse con un sitio de unión al cebador que es independiente de la secuencia que se va a amplificar. Como resultado, los cebadores universales son especialmente útiles en las reacciones de amplificación multiplexadas, en las que un número de diferentes secuencias diana se pueden amplificar usando un único par de cebadores universales.

El término "muestra biológica" se refiere al material obtenido a partir de cualquier fuente viva (o anteriormente viva)

por ejemplo, un ser humano o un animal (por ejemplo, mamíferos como animales bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos, y porcinos, peces, aves, etc.), plantas, bacterias, hongos, protistas, o virus) y que contiene uno o más ácidos nucleicos y/o poblaciones de otras biomoléculas diana. Las muestras biológicas pueden estar hechas de materiales sólidos (por ejemplo, tejido, aglomerados celulares, biopsias, etc.), o fluidos biológicos (por ejemplo, orina, sangre, saliva, líquido amniótico, lavado bucal, linfa, sudor, esputo, mucosa, lágrimas, etc.). Las muestras biológicas representan un subgénero de “muestras” que pueden ser cualquier muestra de material que contiene una o más moléculas diana que se pueden detectar y/o analizar usando uno o más de los reactivos de selección de acuerdo con la invención.

Una “biomolécula” se refiere a una molécula que se produce de forma natural en un sistema biológico (por ejemplo, un organismo). Clases representativas de biomoléculas incluyen ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, anticuerpos, enzimas, hidratos de carbono, lípidos, metales, y toxinas. Una “biomolécula” diana es una biomolécula a la que se dirige un reactivo de detección dirigido de la invención.

El término “región codificante” de un molde de compómero se refiere a una región que codifica un compómero o un sustrato de escisión, según el caso.

Dos moléculas de ácido nucleico monocatenario son “complementarias” en al menos una parte de sus respectivas longitudes si una región de tamaño suficiente (es decir, un número de subunidades de nucleobase, por ejemplo, nucleótidos) permite un enlace de hidrógeno suficiente entre los dos ácidos nucleicos para estabilizar el dúplete formado por hibridación de los dos ácidos nucleicos. Así, para los fines de la presente invención, se considera que un primer ácido nucleico es perfectamente complementario de un Segundo ácido nucleico cuando cada base del primer polinucleótido está emparejada con una base complementaria del segundo polinucleótido en la región de complementariedad prevista, que puede incluir la totalidad o solo una parte de cualquiera o ambas moléculas de los dos ácidos nucleicos. Como se apreciará, dos moléculas de ácido nucleico monocatenario pueden también ser menos que perfectamente complementarias en la región de complementariedad prevista y seguir mostrando complementariedad suficiente para permitir la hibridación de los ácidos nucleicos en condiciones de hibridación restrictiva.

“Complemento” se usa como un sinónimo de un ácido nucleico que es complementario de otro ácido nucleico.

Un “compómero” es una molécula sintetizada en un ensayo de detección de diana a partir de un molde de compómero para indicar de forma indirecta la presencia de una molécula diana particular en la muestra a analizar. Los compómeros están constituidos por una o más subunidades. Las subunidades especialmente preferidas para las polimerizaciones de compómeros son las subunidades de nucleobase.

Un “molde de compómero” se refiere a la parte de un reactivo de detección de diana de la invención que codifica un compómero.

Se dice que un compómero está “correlacionado con” una molécula diana cuando se sabe de antemano que la detección de una especie de compómero dada significa que la correspondiente molécula diana estaba presente en la muestra a ensayar. Dicha correlación se debe al diseño del reactivo de detección de diana, ya que se sabe que el resto de detección diana reacciona específicamente con la diana concreta. De este modo, dicha interacción permite la posterior generación del compómero codificado por el reactivo de detección de diana. Así, se dice que una especie de compómero correspondiente a una molécula diana está “correlacionado con” la molécula diana particular, de forma que la detección de un compómero concreto indica indirectamente la presencia de la correspondiente molécula diana en la muestra en análisis.

Un “tramo contiguo” de moléculas se refiere a una región dentro de un polímero lineal en el que las moléculas a partir de las cuáles se ha sintetizado el polímero son del mismo tipo. Por ejemplo, un tramo contiguo de ribonucleótidos se refiere a un polinucleótido (o parte del mismo) en el que todos los nucleótidos del tramo contiguo son ribonucleótidos. Otros nucleótidos, tales como los desoxirribonucleótidos, no están incluidos en el tramo continuo, aunque pueden incluirse en otra parte del polinucleótido si el polímero comprende más nucleótidos que meramente el tramo contiguo de ribonucleótidos.

Una “característica definida” se refiere a una característica conocida que permite que una especie componente se detecte y distinga de otra. Las características definidas incluyen composiciones químicas definidas, masas definidas, longitudes definidas, tamaños definidos, secuencias definidas y estructuras definidas. Tener una “composición química definida” significa que la identidad de cada base del compómero es conocida. Tener una “fórmula molecular definida” significa que el número e identidad de cada átomo que comprende la molécula es conocido. Como resultado, la masa o el intervalo de masas (debido a la variación isotópica) de la molécula también puede estar definido, es decir, la molécula tiene una “masa definida”. Por ejemplo, la masa molecular específica se puede determinar sumando las masas de los átomos representados por la fórmula química de la molécula (por ejemplo, $C_6H_{12}O_6$). Un “intervalo de masa” refleja el intervalo de masas que pueden tener moléculas con la misma fórmula química debido a la inclusión de diferentes isótopos. Tener una “longitud definida” o un “tamaño definido” significa que se sabe cuántas subunidades comprende un compómero particular. Por ejemplo, un compómero que contiene diez nucleótidos se dice que tiene una longitud de diez nucleótidos. Una “secuencia definida” significa que el

compómero tiene una secuencia de nucleobases específica, dicha secuencia se puede determinar por cualquier técnica adecuada (por ejemplo, mediante hibridación, secuenciación, etc.). Una "estructura definida" significa que un compómero tiene una estructura tridimensional (por ejemplo, un epítipo) que se puede reconocer mediante un reactivo (por ejemplo, un anticuerpo) específicamente reactivo con la estructura. Como se apreciará, en algunos casos un compómero se puede clasificar y por tanto detectar, por uno o más procedimientos diferentes, cada uno de los cuales está basado en el análisis de una característica concreta. Por ejemplo, los compómeros constituidos por subunidades de nucleobases tendrán masas (o intervalos de masas) de composición química, secuencias y longitudes definidas. De acuerdo con esto, se pueden detectar mediante una variedad de procedimientos de detección basados en los elementos, la masa, la secuencia y la longitud. Cuando se emplean los sistemas de detección adecuados, los compómeros que tienen una única característica definida (por ejemplo, una masa, composición química única definida etc.) se pueden distinguir fácilmente de otras especies de compómeros.

Un "gen" se refiere a un locus genético particular, o región de una molécula de ADN, que codifica un producto génico (es decir, molécula de polipéptido o ARN). Además de la(s) región(es) codificante(s) de la estructura, un gen puede contener regiones no codificantes, incluyendo intrones, regiones transcritas pero no traducidas, y elementos de regulación en dirección 5' y en dirección 3' de las regiones de codificación. Dependiendo del contexto, un "gen" puede comprender opcionalmente la secuencia de nucleótidos necesaria para la expresión del gen (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.).

El término "genotipo" se refiere a la identidad de los alelos de al menos uno de los genes del genoma de un sujeto. "Genotipar" una muestra se refiere a determinar el alelo específico o el nucleótido específico de una ubicación concreta que lleva un sujeto (en todas sus células o solo en parte). Así, un genotipo se puede referir a uno o más alelos específicos.

Un "híbrido" o "duplete" se refiere a una molécula que comprende dos polímeros lineales hibridados en al menos una parte de sus respectivas longitudes para formar un híbrido estable o molécula duplete. En un híbrido, cada polímero lineal está compuesto por subunidades de nucleobases. Los ejemplos de estos polímeros incluyen moléculas de ARN y ADN monocatenario que comprenden nucleobases naturales y/o modificadas, y/o químicas de estructura. Las regiones bicatenarias de los híbridos son lo suficientemente estables para que se puedan mantener durante la manipulación deseada, por ejemplo, para servir como un cebador que se puede extender catalíticamente, de forma que dichos dupletes se puedan separar de las moléculas monocatenarias, si se desea, etc.

"Hibridación" se refiere a la capacidad de dos hebras de ácido nucleico total o parcialmente complementarias para reunirse en unas condiciones especificadas de un ensayo de hibridación, en orientación paralela o preferiblemente antiparalela para formar una estructura estable que tiene una región bicatenaria. Las dos hebras constituyentes de esta estructura bicatenaria, denominada a veces híbrido o duplete, se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno. Aunque estos enlaces de hidrógeno se suelen formar entre nucleótidos que contienen las bases adenina y timina o uracilo (A y T o U) o citosinas y guanina (C y G) en una única hebra de ácido nucleico, el emparejamiento de bases también puede llevarse a cabo entre bases que no sean miembros de estos pares "canónicos", tal como se conoce en la técnica.

El término "definido isotópicamente" se refiere a una población de moléculas con la misma fórmula química, en la que una o más de las especies atómicas que comprende la molécula tiene una distribución isotópica más restringida (debido a enriquecimiento o agotamiento isotópico) de la que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el carbono tiene de forma típica varios isótopos naturales (por ejemplo, $^{12}\text{C}_6$, $^{13}\text{C}_6$, y $^{14}\text{C}_6$), cada uno de los cuales tiene un número diferente de neutrones (6, 7, y 8, respectivamente). Cuando se hace referencia a un isótopo de un elemento particular, se usa la fórmula " AX_Z ", en la que "X" es el símbolo químico del átomo, "Z" es el número atómico (igual al número de protones de un átomo del elemento), y "A" es la suma del número de protones y neutrones del isótopo concreto. Se ha notificado la abundancia relativa de algunos de los isótopos naturales de C, H, N, y O (véase, por ejemplo, Bievre y Taylor (1993), Int. J. Mass. Spectrom. Ion Phys., vol. 123:149). Para el carbono, las abundancias relativas (expresada como porcentaje) de los isótopos $^{12}\text{C}_6$ y $^{13}\text{C}_6$ son 98,90 y 1,10, respectivamente. Para el hidrógeno, las abundancias relativas de los isótopos $^1\text{H}_1$ y $^2\text{H}_1$ son 99,985 y 0,015, respectivamente. Las abundancias relativas de los isótopos de $^{14}\text{N}_7$ y $^{15}\text{N}_7$ del nitrógeno son 99,634 y 0,366, respectivamente, mientras que los isótopos de oxígeno $^{16}\text{O}_8$, $^{17}\text{O}_8$, y $^{18}\text{O}_8$ tienen una abundancia relativa de 99,762, 0,038, y 0,200, respectivamente. De lo anterior, una población de moléculas de una especie particular (por ejemplo, un nucleósido como la adenosina) estaría definido isotópicamente con respecto al carbono si la abundancia relativa de los isótopos del carbono $^{12}\text{C}_6$ y $^{13}\text{C}_6$ en la población fueran 99,90 y 0,10, respectivamente. Así, para las moléculas que constan de varias especies atómicas, una o más de las cuales pueden tener más de un isótopo natural, puede ser deseable sintetizar la molécula usando los átomos con un enriquecimiento en los isótopos más habituales, es decir, más de estos está presente en términos relativos, en comparación con el(los) isótopo(s) menos prevalentes de dicho elemento o un isótopo de menor prevalencia (o con la menor prevalencia), quedan agotados. Los procedimientos para enriquecimiento y agotamiento isotópico son conocidos en la técnica.

Una "marca" se refiere a una molécula de permite que la molécula adherida a la marca se detecte mediante un procedimiento directo o indirecto. Aquí, detección "directa" se refiere a procedimientos de detección que no requieren la interacción de otra molécula con la marca para la detección. Las marcas que se pueden detectar directamente incluyen radioisótopos, moléculas luminiscentes, molécula de fluorescentes, y otras moléculas cuya

presencia se puede detectar directamente. La detección “indirecta” se refiere a procedimientos que requieren que una o más moléculas interactúen con el resto de marca para que se produzca la detección. Las marcas que se pueden detectar indirectamente incluyen un miembro de un par de unión de alta afinidad (por ejemplo, uno de biotina y estreptavidina, un antígeno y uno o más anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) y por tanto específico, etc.)

- 5 Una “biblioteca” se refiere a una colección de dos o más especies moleculares. En el contexto de los compómeros, una biblioteca comprende una pluralidad de diferentes especies de compómero. De forma típica, cada especie de compómero se correlaciona con una molécula diana diferente, entendiéndose que una “molécula diana diferente” puede significar variantes genéticas o estructurales de la misma molécula (por ejemplo, un gen o polipéptido), así como moléculas diana que tengan genes o polipéptidos diferentes codificados por genes diferentes. En el contexto del reactivo de detección de dianas, una biblioteca comprende dos o más especies de reactivos dirigidos diferentes. En cualquier caso, un miembro de una biblioteca se diferencia de otro debido a la diferencia en los restos de unión a diana y/o los moldes de compómero.

- 15 En el contexto de la presente invención, los términos “multiplete”, “multiplexar”, y similares, se refieren a la capacidad para detectar y/o analizar múltiples especies de biomoléculas diana en un único ensayo. Por ejemplo, una pluralidad de reactivos de detección de dianas diferente, cada uno específico de una especie distinta de biomolécula diana, se puede utilizar para analizar una muestra biológica en un único ensayo. Si todo o parte de la especie de biomolécula diana está presente en la muestra, los resultados del ensayo así lo indicará. Por lo tanto, el multiplexado aumenta en gran medida la eficacia del ensayo. De forma típica, los multipletes permiten el análisis de más de aproximadamente 10, preferiblemente más de aproximadamente 50, 100, 250, 500, o 1.000, e incluso más preferiblemente más de 1.000 especies diferentes de biomoléculas en un único ensayo. Por supuesto, el número de especies de molécula diana que se puede detectar con un ensayo multiplexado dado dependerá de factores tales como, por ejemplo, la composición química del compómero codificado por los diferentes reactivos de detección de dianas utilizados, el tipo de detector usado, la sensibilidad del detector, etc.

- 25 El término “gen mutado” se refiere a una forma alélica de un gen que es capaz de alterar el fenotipo de un sujeto que tiene la mutación relativa a un sujeto que no tiene el gen mutado. Si un sujeto debe ser homocigótico para que esta mutación tenga un fenotipo alterado, se dice que la mutación es recesiva. Si una copia del gen mutado es suficiente para alterar el fenotipo del sujeto, se dice que la mutación es dominante. Si un sujeto tiene una copia del gen mutado y tiene un fenotipo que es intermedio entre el de un sujeto homocigótico y un sujeto heterocigótico (para dicho gen), la mutación puede ser codominante. El término “mutación” tal como se usa en el presente documento se refiere a una diferencia en la secuencia de nucleótidos en una localización genética particular (por ejemplo, la posición de un nucleótido en un gen) entre diferentes genomas o individuos que tiene una frecuencia inferior al 1%.

- 35 En el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a moléculas poliméricas bicatenarias o monocatenarias hechas a partir de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos naturales (por ejemplo, ARN, ARNm, ARNr, ARNt, ARNs nuclear pequeño, ADN, ADNc, y copolímeros de ARN/ADN), así como ácidos nucleicos modificados/no naturales, a menudo conocidos como miméticos de ácido nucleico. Los ejemplos de miméticos de ácido nucleico incluyen los que tienen modificaciones o sustituciones fosfodiéster, incluyendo uniones entre subunidades de fosforotioato, metilfosfonato, boranofosfato, amida, éster, y éter, así como sustituciones completas de subunidades por moléculas tales como enlaces de escisión (por ejemplo, restos fotoescindibles de nitrofenilo), y subunidades de nucleobases diferentes a los nucleósidos y nucleótidos. Un ácido nucleico “diana” es un ácido nucleico que contiene una secuencia diana de ácido nucleico.

- 40 Una “secuencia de nucleótidos” se refiere en general a las secuencias lineales de nucleobases que incluyen una molécula de ácido nucleico particular. Salvo que se indique de otra forma, la secuencia de nucleótidos se escribe desde 5' a 3'. Una secuencia de nucleótidos “diana” se refiere a una parte concreta de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico presente en una muestra a la que se dirige, y por tanto es prácticamente complementaria, la parte de oligonucleótido del correspondiente reactivo de detección de diana.

“Amplificación de ácido nucleico” se refiere a un procedimiento para aumentar el número de moléculas de ácido nucleico particulares. La amplificación de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ser tanto lineal como exponencial, aunque se prefiere la ampliación exponencial.

- 50 Una “nucleobase” se refiere a una base (es decir, una purina o una a pirimidina) capaz de formar puentes de hidrógeno con una base complementaria para formar un par de bases. Las bases incluyen adenina (“A”), citosina (“C”), guanina (“G”), hipoxantina, ácido orótico, timina (“T”), uracilo (“U”), y xantina. Los pares de bases incluyen los pares de bases de ADN de Watson-Crick canónicos A:T, T:A, G:C, C:G, y en el ARN, U sustituye T. Una “subunidad de nucleobases” se refiere a una unidad monomérica concreta de un polímero lineal, en el que la subunidad comprende una nucleobase vinculada a una estructura que permite polimerizar la subunidad de forma que el polímero monocatenario resultante presenta las nucleobases orientadas en el mismo de forma tal que el polímero puede formar un híbrido bicatenario estable con una molécula de ácido nucleico complementaria (por ejemplo, un molécula de ácido nucleico diana natural en una muestra biológica. Los nucleósidos y nucleótidos representan ejemplos preferidos de subunidades de nucleobases útiles para llevar a la práctica la invención. Las nucleobases también se pueden modificar para incluir una o más moléculas de composición conocida para proporcionar una modificación de la masa. Estos restos modificadores de masa se han denominado “etiquetas de masa”, y las

nucleobases o subunidades de nucleobases de masa modificada resultantes se denominan “nucleobases etiquetadas por masa” y “subunidades de nucleobases etiquetadas por masa”, respectivamente.

Un “nucleósido” es una molécula que comprende una base púricas o pirimidínicas unida a un resto azúcar (por ejemplo, una a β -D-ribosa o una β -D-2-desoxirribosa) mediante un enlace N-glicosídico entre el C-1 del azúcar y el N-9 (en el caso de las bases pirimidínicas) o N-1 (en el caso de las bases púricas). El resto azúcar es una 2'-desoxirribosa en el caso de desoxirribonucleótidos y un resto ribosa en el caso de un ribonucleótido. También se pueden utilizar análogos de desoxirribosa y ribosa, incluyendo 2',3'-desoxi así como una amplia gama de otros miméticos de nucleótidos que son bien conocidos en la técnica. Los miméticos incluyen nucleótidos de finalización de cadena tales como 3'-O-metilo, base halogenada, o bien tales como sustituciones; estructuras de azúcar alternativas incluyendo no de azúcar, estructuras de anillo de alquilo. Los ejemplos representativos de nucleósidos incluyen adenosina, citidina, guanosina inosina, orotidina, timidina, uridina, y xantosina. Una “subunidad de nucleósido” se refiere a un nucleósido o polinucleótido particular.

Un “nucleótido” se refiere a un nucleósido que tiene uno o más grupos fosfato esterificados al átomo de carbono 5' de su resto azúcar. Los nucleótidos pueden ser tanto naturales como sintéticos. Los ejemplos representativos de nucleótidos útiles para llevar a la práctica de la invención incluyen monofosfato, difosfato, y trifosfato de adenosina; monofosfato, difosfato, y trifosfato de citidina; monofosfato, difosfato, y trifosfato de guanosina; monofosfato, difosfato, y trifosfato de inosina; orotidina, monofosfato, difosfato, y trifosfato de timidina; monofosfato, difosfato, y trifosfato de uridina; y xantosina.

Un “oligonucleótido” es un polímero hecho a partir de dos o más nucleósidos y/o subunidades de nucleobases acopladas entre sí, por ejemplo, mediante la polimerización de nucleótidos. Un oligonucleótido puede estar constituido por subunidades de nucleobases que incluyen, por ejemplo, nucleobases encontradas en el ADN y/o ARN y análogas de las mismas. Cuando las subunidades de nucleobases son nucleósidos, los restos azúcar de las subunidades de nucleósido pueden ser ribosa, desoxirribosa o análogos de las mismas, incluyendo, por ejemplo, ribonucleósido que tiene una sustitución 2'-O-metilo en el resto ribofuranosilo. Las subunidades de nucleobases pueden estar unidas por uniones tales como enlaces fosfodiéster, uniones modificadas, o mediante uniones entre restos no nucleotídicos que no impiden la hibridación del oligonucleótido con su secuencia de ácido nucleico diana. Las uniones modificadas incluyen aquellas uniones en las que un enlace fosfodiéster convencional está sustituido por un enlace distinto, como un enlace fosforotioato, o un enlace metilfosfonato. Las subunidades de nucleobases pueden estar unidas, por ejemplo, sustituyendo el fosfato de desoxirribosa natural de la estructura del ADN por una estructura de pseudopéptido, tal como estructura de 2-aminoetilglicina que acopla las subunidades de nucleobases mediante un enlazador de carboximetilo con la amina secundaria central. Los análogos de ADN que tienen una estructura de pseudo péptido se denominan habitualmente como “ácidos nucleicos péptidos” o “ANP” (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos nº 5.539.082). Otros ejemplos no limitantes de oligonucleótidos u oligómeros contemplados mediante la presente invención incluyen análogos de ácido nucleico que contienen análogos de nucleósidos y nucleótidos bicíclicos y tricíclicos denominados como “ácidos nucleicos bloqueados”, “análogos de nucleósido bloqueados” o “ANB” (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos nº 6.083.482). La presente invención contempla cualquier análogo de ácido nucleico, siempre que el oligonucleótido modificado se pueda hibridar con un ácido nucleico diana en condiciones de un ensayo de hibridación o en condiciones de amplificación rigurosas. Los oligonucleótidos que tienen una secuencia definida de subunidades de nucleobases se pueden producir por técnicas conocidas del experto en la técnica, tales como la síntesis química u otros procedimientos adecuados.

Un oligonucleótido es “sustancialmente complementario” a su molécula de ácido nucleico diana correspondiente cuando contiene al menos 6, y preferiblemente al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más nucleobases contiguas que tienen al menos un 80% de complementariedad, preferiblemente al menos un 90% de complementariedad, y lo más preferible al menos un 100% de complementariedad, con una extensión de nucleótidos contiguos en el ácido nucleico diana correspondiente. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente las modificaciones que podrían realizarse en las condiciones del ensayo de hibridación en diversos porcentajes de complementariedad para permitir la hibridación del oligonucleótido con la secuencia diana evitando a la vez niveles inaceptables de hibridación no específica. El grado de complementariedad se determina comparando el orden de las nucleobases que conforman las dos regiones para las que se está comparando la complementariedad y no tiene en cuenta otras diferencias estructurales que pueden existir entre los dos ácidos nucleicos con, la condición de que las dos diferencias estructurales no eviten el enlace de hidrógeno entre bases complementarias. El grado de complementariedad entre dos ácidos nucleicos se puede expresar también en términos del número de emparejamientos incorrectos de nucleobases presente en las regiones que se están comparando, que puede variar desde 0 a 4, preferiblemente 0 a 2, emparejamientos incorrectos de nucleobases.

Una composición, procedimiento, máquina, o artículo de fabricación “patentable” de acuerdo con la invención significa que la materia sujeto satisface todos los requisitos estatutarios para la patentabilidad en el momento en el que se lleva a cabo el análisis. Por ejemplo, con respecto a la novedad, la falta de actividad inventiva, o similar, si investigaciones posteriores desvelan que una o más reivindicaciones abarcan una o más realizaciones que podrían negar la novedad, la actividad inventiva, etc., la(s) reivindicación(es), que están limitadas por definición a las realizaciones “patentables”, excluyen específicamente la(s) realización(es) no patentable(s). También, las

reivindicaciones adjuntas al presente documento deberán interpretarse tanto con el fin de proporcionar el alcance razonable más amplio, como preservar su validez. Además, si uno o más de los requisitos estatutarios para la patentabilidad se ha modificado o se han cambiado los estándares para evaluar si un requisito estatutario particular para la patentabilidad se satisface desde el momento de presentar la presente solicitud o de su concesión como patente hasta el momento en el que se analiza de nuevo la validez de una o más de las reivindicaciones adjuntas, las Reivindicaciones deberán interpretarse de forma que (1) preserve su validez y (2) proporcione la interpretación razonable más amplia bajo las circunstancias.

Una "pluralidad" significa más de uno.

El término "polimorfismo" se refiere a la incidencia de dos o más secuencias genómicas o alelos alternativos entre o en medio de diferentes genomas o individuos. De esta manera, "polimórfico" se refiere a la coexistencia de más de una forma de un gen o parte (por ejemplo, variante alélica) del mismo. Una parte de un gen del cual existen al menos dos diferentes formas, es decir, dos diferentes secuencias de nucleótidos, se denomina "región polimórfica" de un gen. Una región polimórfica puede comprender tan poco como un único nucleótido, la identidad del cual difiere en diferentes alelos. Un "polimorfismo de un único nucleótido" o "SNP" es un cambio en un único par de bases. Normalmente, se produce un polimorfismo de un único nucleótido como resultado de una sustitución de un nucleótido por otro nucleótido en el sitio polimórfico. La eliminación o la inserción de un único nucleótido puede proporcionar también un aumento de los polimorfismos de un único nucleótido. Una región polimórfica puede implicar también múltiples nucleótidos contiguos, como en sustituciones, reordenaciones, inserciones, y eliminaciones de algunos nucleótidos, aunque estos polimorfismos son menos comunes.

Un "polinucleótido" se refiere generalmente a un polímero lineal de nucleótidos, aunque si el polímero contiene una o más subunidades de nucleobases diferentes de un nucleótido o nucleósido, a fines de la invención, debe seguirse considerando como un polinucleótido. Los polinucleótidos preferidos son aquellos en los que las diversas subunidades se unen mediante enlaces fosfodiéster 5'-3' entre nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen moléculas de ADN y ARN monocatenario y bicatenario, que incluyen aquellas en las que se generan una o más hebras de forma recombinante o sintética.

Un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de restos de aminoácidos (que incluye restos de aminoácidos naturales y no naturales). De esta manera, los polipéptidos incluyen péptidos y proteínas, que incluyen proteínas, enzimas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y conjugados de proteínas naturales y genomanipuladas. En las realizaciones preferidas los polipéptidos son anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, enzimas, receptores, ligandos de receptores, proteínas reguladoras, proteínas de unión a ácidos nucleicos, hormonas, o productos de proteínas de un procedimiento de expresión, tal como un procedimiento de expresión en fago o un procedimiento de expresión en bacteria.

El término "se hibrida preferentemente" significa que en las condiciones restrictivas de hibridación del ensayo, los ácidos nucleicos complementarios (o porciones complementarias de ácidos nucleicos que contienen también porciones no complementarias) se hibridan para formar híbridos estables. Se puede medir la hibridación preferente utilizando técnicas normalizadas. Preferiblemente, existe al menos aproximadamente una diferencia de 10 veces en la hibridación entre una especie de ácido nucleico y su ácido nucleico complementario, en comparación con un ácido nucleico no complementario, de forma más preferible al menos una diferencia de 100 veces, y lo más preferible al menos aproximadamente una diferencia de 1.000 veces. Preferiblemente, las condiciones de reacción son tales que la hibridación entre ácidos nucleicos no complementarios en una muestra de ensayo no es mayor que el nivel de la señal de fondo.

Una "sonda" se refiere a una molécula que comprende como mínimo al menos un resto de unión a la diana. Las sondas pueden comprender de esta manera dos o más restos diana que se pueden unir para formar la sonda. Por ejemplo, una sonda concreta puede comprender dos oligonucleótidos que, cuando se hibridan con sus respectivas moléculas diana, llegan a juxtaponerse de tal manera que se pueden unir (*por ejemplo*, ligarse) para formar una molécula de sonda completa. Las sondas (o sus partes constituyentes) pueden contener también otros componentes, que incluyen marcas y etiquetas. Las etiquetas sirven como restos que permiten a las moléculas a las cuales se unen estar aisladas de otras moléculas presentes en una mezcla (*por ejemplo*, una solución).

Un "promotor" significa la mínima secuencia de ADN suficiente para dirigir la transcripción de un polipéptido codificado por una molécula de ADN a la cual el promotor se une de manera operable, es decir, existe una unión funcional entre el promotor y la secuencia de codificación (por ejemplo, un región que codifica un compómero), de tal manera que la secuencia de codificación se puede transcribir mediante una ARN polimerasa. En general, un "promotor" se refiere a una variedad de secuencias control de ácido nucleico que pueden dirigir la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias para la unión de la ARN polimerasa, el inicio de la transcripción, y el alargamiento. Los promotores pueden ser tanto procariotas como eucariotas en origen, prefiriéndose los promotores de bacteriófagos tales como el T7, T3 y SP6. Los promotores eucariotas incluyen, entre otros, los promotores de CMV, SV40, retrovirus, y adenovirus. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden estar localizados como máximo como varios miles de pares de bases a partir del sitio de inicio de la transcripción. Los promotores incluyen también promotores "consenso", que no se producen de forma natural pero que se pueden

diseñar, por ejemplo, comparando las secuencias del promotor de los genes transcritos a altos niveles para desarrollar una secuencia del promotor que refleja al menos una, preferiblemente alguna, y lo más preferible todas las bases “consenso” (normalmente, el nucleótido más frecuentemente representado en la posición concreta del nucleótido entre las secuencias que se están comparando), de las subunidades de las nucleobases que comprende el promotor.

El término “condiciones de reacción” significa las condiciones de reacción que permiten a las moléculas que interactúan específicamente entre sí interactuar de forma preferente. Las condiciones de reacción incluyen la temperatura, las concentraciones del soluto, el pH, las condiciones iónicas, etc. Las condiciones de hibridación restrictivas son condiciones de reacción representativas en el contexto de la hibridación del ácido nucleico.

El término “grupo reactivo” se refiere a un resto químico de una molécula más grande que es capaz de reaccionar con un grupo reactivo de otra molécula utilizando una química específica.

Los términos “separado”, “purificado”, “aislado” y similares significan que uno o más componentes de una muestra contenida en un recipiente que mantiene una muestra están o se han eliminado físicamente de, o se han diluido en presencia de, uno o más componentes restantes de la muestra presentes en el recipiente. Los componentes de la muestra que se pueden eliminar o diluir durante una etapa de separación o purificación incluyen, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, inhibidores, ácidos nucleicos no diana, y moléculas de sonda no unidas. Con procedimientos de captura de dianas, los ácidos nucleicos diana unidos a sondas de captura inmovilizadas se retienen preferiblemente en la muestra durante la etapa de separación o purificación.

El término “especie” se usa en el presente documento en diversos contextos, *por ejemplo*, especies de compómeros, especies de moléculas diana, especies de nucleótidos, etc. En cada contexto, el término se refiere a una población de moléculas químicamente indistintas, de las citadas en el contexto concreto. Por ejemplo, una “especie de compómero” es una población de compómeros que tienen la misma composición química, y por tanto eficazmente la misma masa. Por supuesto, debido a la incidencia de la variación isotópica en las moléculas que tienen una estructura química idéntica, las moléculas dentro de una especie dada pueden tener masas ligeramente diferentes, y de esta manera la “masa” de una especie molecular dada (*por ejemplo*, un compómero) representa de hecho un pequeño intervalo de masas. Dependiendo de factores tales como el nivel de multiplexado en un ensayo dado, la sensibilidad del sistema analítico que se está usando, etc., puede desearse sintetizar compómeros a partir de subunidades isotópicamente definidas (*por ejemplo*, trifosfatos de ribonucleótido) para definir de forma más estrecha el pequeño intervalo de masas de un compómero concreto y mejorar por tanto la resolución de los picos de masas que aparecen en los espectros resultantes del análisis de la muestra.

En el presente documento, “estable” se refiere a una interacción entre dos moléculas (por ejemplo, las hebras de un dúplete de ácido nucleico sobre sus regiones de complementariedad) que es suficientemente estable de tal manera que las moléculas se pueden mantener para el fin deseado de la manipulación. Por ejemplo, una interacción “estable” entre un cebador y su sitio de unión a un cebador homólogo se refiere a una que permitirá al cebador extenderse bajo las condiciones de reacción adecuadas para las reacciones de extensión.

Las frases “condiciones de ensayo de hibridación restrictiva”, “condiciones de ensayo de hibridación”, “condiciones de hibridación restrictivas”, “condiciones restrictivas”, y similares significan condiciones de reacción que permiten ácidos nucleicos complementarios (por ejemplo, un oligonucleótido, o una región de unión a una secuencia diana de un oligonucleótido que comprende además otras regiones, y un ácido nucleico que tiene una secuencia de bases complementaria a la anterior) hibridarse de forma preferente. Las condiciones de ensayo de hibridación restrictivas pueden variar dependiendo de diversos factores, incluyendo el contenido de GC y la longitud de las regiones de complementariedad entre los ácidos nucleicos, el grado de similitud entre las secuencias de complementariedad y otras secuencias que pueden estar presentes en la muestra. Las condiciones de hibridación incluyen la temperatura y la composición de los reactivos o disoluciones de hibridación.

Una “subunidad” se refiere a una parte de una molécula más grande. De esta manera, un polímero está comprendido por dos o más subunidades. Las subunidades a modo de ejemplo incluyen aminoácidos individuales, subunidades de nucleobases, nucleósidos en un ADN o ARN y nucleótidos individuales utilizados para sintetizar un ácido nucleico u oligonucleótido, así como multímeros de la subunidad (*por ejemplo*, moléculas que comprenden dos, tres, cuatro, o más subunidades, por ejemplo, nucleótidos) que se pueden usar, *por ejemplo*, como intermedios en la síntesis de oligonucleótidos o péptidos. En otros contextos, si un oligonucleótido contiene dos regiones distintas, *por ejemplo*, un resto de unión a la diana y un molde de compómero, cada una de las distintas regiones se puede referir como una subunidad del oligonucleótido.

Una “etiqueta” es un resto que se puede unir a o se incluye como parte de otra molécula para facilitar la separación entre las moléculas etiquetadas y las moléculas no etiquetadas en un ensayo. Los ejemplos representativos de moléculas que se pueden etiquetar incluyen los reactivos de detección de dianas, sustratos de escisión, y compómeros.

Un “resto de unión a diana” se refiere a una molécula capaz de un reconocimiento molecular específico. Las moléculas capaces de un reconocimiento molecular específico son capaces de generar interacciones de unión

específicas con otras moléculas. En concreto, un resto de unión a la diana es la parte de un reactivo de detección diana de acuerdo con la invención que es capaz de interactuar específicamente con y de unirse a una molécula diana. Los restos de unión están comprendidos por polinucleótidos (*por ejemplo*, oligonucleótidos) y polipéptidos (*por ejemplo*, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) así como aptámeros (*es decir*, moléculas de ácido nucleico sintético que se unen de forma específica o interactúan de otra manera con otras moléculas, incluyendo proteínas y pequeñas moléculas), y pequeñas moléculas (*es decir*, moléculas orgánicas que se producen de forma natural o sintéticas que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 10.000 Da que se unen de forma específica a o interactúan de otra manera con una especie de biomolécula de interés, *por ejemplo*, una proteína diana).

El término “molécula diana” o “diana” se refiere a la presencia, ausencia, o abundancia de una molécula que se va a determinar. Las dianas preferidas son biomoléculas, incluyendo polipéptidos y moléculas de ácidos nucleicos.

Un “ácido nucleico diana” se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de un ácido nucleico diana cuya secuencia está comprendida normalmente por nucleótidos. Los ácidos nucleicos diana pueden ser monocatenarios o bicatenarios. En las moléculas bicatenarias, las hebras se separan preferiblemente en al menos la parte que incluye la secuencia de nucleótidos diana con el fin de facilitar la hibridación del resto de unión a la diana de un reactivo de detección de dianas específico de la secuencia de nucleótidos diana concreta.

Por “secuencia de ácido nucleico diana”, “secuencia de nucleótidos diana”, “secuencia diana”, o “región diana” se entiende una secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos específica que comprende toda o parte de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico diana.

Una “región de unión a una secuencia diana” se refiere a una molécula de ácido nucleico, *por ejemplo*, un oligonucleótido, que tiene una secuencia de bases suficientemente complementaria a su secuencia de ácidos nucleicos diana para formar, *por ejemplo*, un híbrido de oligonucleótido:diana estable para la detección en condiciones de ensayo de hibridación restrictivas. Normalmente, una región de unión a una secuencia diana comprende al menos aproximadamente 6 subunidades de nucleobases, preferiblemente entre 6 y aproximadamente 500 o 1.000 subunidades de nucleobases.

Una “unidad de transcripción” se refiere a una molécula que codifica un compómero o un sustrato de escisión de acuerdo con la invención. Una unidad de transcripción sirve como molde para sintetizar un compómero de acuerdo con la invención. La síntesis de compómeros se produce preferiblemente mediante la transcripción de la región que codifica el compómero de la unidad de transcripción. De esta manera, las unidades de transcripción incluyen al menos preferiblemente un promotor funcional y región de codificación de un compómero.

En el contexto de la presente invención, “único” se refiere a una especie molecular que difiere de una o más maneras distinguibles del resto de especies moleculares presentes. Preferiblemente, en el contexto de los compómeros, cada especie de compómero generada en una reacción particular será única en comparación con cada una de las otras especies de compómeros producidas en la reacción. De esta manera, incluso si todas las especies de compómeros presentes en una reacción dada deben analizarse, *por ejemplo*, basándose en una única característica definida (*por ejemplo*, la masa), la masa (o el intervalo de masas) de cada especie de compómero será lo suficientemente diferente del resto de especies de compómeros presentes, de tal manera que se puede detectar y resolver en el contexto de un ensayo concreto. En el contexto de las moléculas diana, una “única molécula diana” se refiere a una especie de molécula diana que se puede distinguir del resto de especies de moléculas diana en una reacción dada. Tal como se apreciará, un único gen (u otro locus genético que comprende una extensión de nucleótidos contiguos (preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 1 millón o más de nucleótidos) puede contener múltiples sitios que se pueden dirigir de forma independiente por diferentes especies de reactivos de detección de dianas diferentes (cuyas especies difieren entre sí debido a los diferentes restos de detección de dianas, y debido preferiblemente también a las diferentes especies de moldes de compómeros que codifican especies de compómeros distinguibles).

Resumen de la invención

La presente invención de acuerdo con las reivindicaciones proporciona reactivos y procedimientos para el análisis eficaz de una muestra para determinar si contiene una o más especies diferentes de moléculas diana. De acuerdo con la invención. La detección de una o más especies de moléculas diana concretas en una muestra se produce de forma indirecta, en que la etapa de detección no implica la detección directa de la(s) molécula(s) diana. En vez de esto, se detecta una diana concreta detectando un compómero correlacionado con la misma. En la presente invención, la detección indirecta de una especie concreta de molécula diana se lleva a cabo generando la especie de compómero correspondiente durante un ensayo. De esta manera, una especie de compómero estará disponible para la detección solo si la molécula diana con la que está correlacionada está presente en la muestra.

Cada especie de compómero se genomanipula para comprender una, dos o tres especies de subunidades de ribonucleótidos dispuestas para producir una molécula que tiene una masa, secuencia, longitud, o estructura definidas, que permite detectar a esta en una mezcla compleja, de tal manera que la detección del compómero indica que la molécula diana está presente en una muestra. Con el fin de permitir a un compómero correlacionarse con una molécula diana que se va a generar durante el curso de un ensayo, se proporciona un molde de

compómero (o un complemento del mismo) que codifica el compómero deseado como parte de un reactivo de detección a diana específico de la especie concreta de molécula diana. La especificidad de la diana se transmite a los reactivos de detección de dianas por medio de la inclusión de uno o más restos de unión a diana vinculados al molde de compómero. De esta manera, se puede determinar si una molécula diana existe en una muestra poniendo en contacto la muestra con un reactivo de detección de diana específico de la molécula diana para formar los complejos reactivo:diana. En algunas realizaciones, puede ser de utilidad eliminar las moléculas de detección de dianas que no han interactuado con sus moléculas diana homólogas, (*por ejemplo*, puesto que las dianas no están presentes en la muestra, las moléculas diana están presentes, pero a una concentración que da como resultado una unión saturada debido a un exceso de moléculas de un reactivo de detección de dianas, etc.) antes de generar los compómeros. En otras realizaciones, un reactivo de detección de dianas específico de una diana concreta se puede formar solo en presencia de una especie de molécula diana concreta, limitando por tanto cualquier ventaja que se pueda obtener mediante una etapa de purificación, aislamiento, o separación intermedia.

Si una molécula diana está presente en la muestra, el resto de unión a la diana del reactivo de detección de dianas se unirá a esta. Posteriormente, el molde de compómero, que comprende una región codificadora de un compómero, se usa para guiar la generación del compómero codificado (o de un precursor más grande que incluye el compómero). Dado que un compómero dado está correlacionado con, y de esta manera es indicativo de la presencia en una muestra de una molécula diana concreta, la detección del compómero indica de forma indirecta que la molécula diana correspondiente está presente en la muestra. Además, puesto que una especie de compómero concreta tiene una característica definida que permite distinguirla de otra especie de compómero que puede haberse generado también en un ensayo, se puede detectar una pluralidad de diferentes especies de compómeros en un único ensayo, permitiendo por tanto un análisis multiplexado de las muestras complejas, *por ejemplo*, muestras biológicas, de muchas especies de moléculas diana diferentes, particularmente biomoléculas diana (*por ejemplo*, moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, e hidratos de carbono).

Por lo tanto, un aspecto de la invención de acuerdo con las reivindicaciones se refiere a reactivos de detección de dianas patentables comprendiendo cada uno un resto de unión a la diana y un molde de compómero, la detección de los cuales indica de forma indirecta la presencia de una molécula diana concreta correlacionada con el compómero particular. En general, un resto de unión a la diana comprende una molécula específica de una molécula diana, de tal manera que el reactivo de detección de dianas puede unirse de forma específica a o reaccionar de otra forma con la molécula diana en un ensayo. En algunas realizaciones, el resto de unión a la diana comprende un polipéptido, preferiblemente un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor, o un ligando de un receptor que es específico de la molécula diana. En otras realizaciones, el resto de unión a la diana comprende una molécula de ácido nucleico (*por ejemplo*, un oligonucleótido) que dirige de forma específica una secuencia de nucleótidos diana en una molécula de ácido nucleico diana. En otras realizaciones adicionales, la molécula de unión a diana comprende un aptámero o una pequeña molécula.

Independientemente del (de los) resto(s) de unión a diana incluidos en un reactivo de detección de dianas de la invención, el reactivo de detección de dianas incluye también al menos un molde de compómero, o un complemento del mismo, unido de forma directa o indirecta (es decir, mediante un enlazador) al resto de unión a la diana. Como se apreciará, un molde de compómero codifica mínimamente un compómero, la detección del cual indica de forma indirecta la presencia de una especie de molécula diana concreta en una muestra que se está estudiando. El molde de compómero codifica un sustrato de escisión, que es una molécula que comprende un compómero y al menos una subunidad adicional que se puede liberar desde el sustrato de escisión para dar como resultado un compómero. Los moldes de compómero son moléculas de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos.

Se pueden generar compómeros a partir de moldes de compómero mediante cualquier procedimiento adecuado que permita a las subunidades polimerizarse utilizando el molde de compómeros para guiar la generación del compómero (o el sustrato de escisión). El molde de compómero (o el complemento del mismo) codifica una unidad de transcripción. Las unidades de transcripción funcionales comprenden una región promotora unida de manera operativa a una región codificadora del compómero. La transcripción a partir de la unidad de transcripción da como resultado la producción de un compómero, o, si la región que codifica el compómero codifica nucleótidos adicionales, un sustrato de escisión a partir del cual el compómero se puede liberar posteriormente. Los compómeros (o sustratos de escisión) se producen a partir del molde de compómero mediante otros procedimientos, *por ejemplo*, mediante una reacción de extensión (*por ejemplo*, extensión del cebador) que puede estar catalizada enzimáticamente o no.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un tipo patentable de moléculas denominado compómeros útiles en una variedad de análisis químicos. De manera específica, la detección de un compómero indica de forma indirecta que la molécula diana (que incluye dianas biomoleculares correlacionada con la misma está presente en una muestra. A diferencia de las etiquetas de masa notificadas anteriormente y similares, los compómeros se sintetizan durante el curso de un análisis químico concreto tras la reacción con o la unión del resto de detección diana a la molécula diana. Posteriormente, los compómeros se sintetizan y se detectan basándose en su masa definida (*por ejemplo*, mediante espectrometría de masas), utilizando un sistema de detección adecuado. La masa definida de una especie de compómero permite distinguirlo del resto de compómeros. Por supuesto, puesto que la secuencia y la identidad de las subunidades utilizadas para sintetizar un compómero pueden ser independientes de la molécula de la molécula diana correlacionada con el mismo, se pueden seleccionar las subunidades usando otros

criterios, por ejemplo, facilidad de polimerización, coste, estabilidad, formato de detección, etc. Por este motivo, se pueden genomanipular las especies de compómeros para optimizar las diferencias entre especies que, por ejemplo, se pueden generar de forma simultánea durante un ensayo multiplexado concreto.

5 Como se apreciará, los ensayos que emplean compómeros para señalar la presencia de moléculas diana concretas en una muestra simplifican mucho los procedimientos bioquímicos requeridos para analizar una muestra. Además, debido a la(s) característica(s) definida(s) de los compómeros, se pueden genomanipular para el uso con sistemas de detección específicos, se puede generar una pluralidad de diferentes especies de compómeros y resolverse en un único ensayo, facilitando el análisis multiplexado de muestras complejas tales como muestras biológicas.

10 Los compómeros (y los sustratos de escisión) se sintetizan a partir de subunidades que utilizan una parte de molde de compómero de un reactivo de detección de dianas como una guía. Si se desea, se pueden ensamblar subunidades monoméricas para la generación de un compómero en dímeros, trímeros, y otras subunidades poliméricas intermedias antes de su inclusión en cualquier ensayo. En cualquier acontecimiento, un molde de compómero guía la adición en serie de especies de la subunidad a la molécula en crecimiento. En la divulgación, los
15 moldes de compómeros comprenden polímeros de subunidades de nucleobases que tienen secuencias de nucleobases definidas. Por tanto, un compómero generado a partir de dicha molécula molde tendrá una secuencia de subunidades correspondiente (*por ejemplo*, nucleobases) ordenada de acuerdo con la molécula molde de compómero. Los nucleósidos y nucleótidos representan tipos de subunidades particularmente preferidos para la síntesis de compómeros comprendidos por subunidades que comprenden nucleobases. Por tanto, cuando se
20 sintetizan compómeros a partir de nucleótidos trifosfatos (*es decir*, nucleótidos que tienen tres grupos fosfato unidos mediante ésteres a la posición C-5' del resto de azúcar), se prefiere usar las enzimas adecuadas para catalizar su síntesis. Las enzimas particularmente preferidas útiles para este fin son las ARN polimerasas dependientes de ADN, tales como las ARN polimerasas T7, T3, y SP6, en cuyo caso, los nucleótidos son preferiblemente ribonucleótidos. Para los compómeros generados a partir de un cebador por medio de una extensión del cebador, por ejemplo, las
25 enzimas preferidas incluyen las ADN polimerasas Taq, el fragmento Klenow, T4, T7, y la ADN polimerasa I de *E. coli*, y las transcriptasas inversas retrovíricas.

En los compómeros de la divulgación pueden estar comprendidas subunidades de aminoácidos o sacáridos. En las divulgaciones que emplean aminoácidos, su secuencia viene dictada normalmente por una molécula de ARN transcrita a partir de un molde de compómero (o un producto de ácido nucleico derivado de la anterior). De esta
30 manera, en estas divulgaciones, el ARN transcrito (o generado de otra forma) a partir del molde de compómero sirve como un intermedio (*es decir*, un "compómero intermedio") para la posterior generación del compómero. Por ejemplo, tras la transcripción, se puede traducir el ARNm para generar compómeros basados en péptidos, o precursores más grandes a partir de los cuales se pueden liberar posteriormente los compómeros (*por ejemplo*, mediante técnicas físicas, químicas, o enzimáticas adecuadas) y detectarse utilizando un sistema de detección
35 adecuado. En las divulgaciones en las que los intermedios de compómero son péptidos traducidos a partir de un ARNm transcrito de un molde de compómero, los péptidos se sintetizan preferiblemente a partir de moldes de ARNm en una reacción de traducción *in vitro*.

En otras divulgaciones adicionales, los compómeros se sintetizan de forma no enzimática a partir de moldes de compómeros. Por ejemplo, se pueden utilizar subunidades de nucleobases diseñadas para la polimerización
40 mediante una química de polimerización adecuada. En dichas realizaciones, los compómeros se sintetizan normalmente mediante el alargamiento en serie de un polímero de compómero nascente, en el que en cada etapa, se polimeriza una nueva subunidad en un grupo reactivo en un resto terminal del polímero en crecimiento. Dichas síntesis se producen generalmente a través de múltiples ciclos de desprotección y acoplamiento para asegurar la incorporación de todas las subunidades en los compómeros más grandes posibles codificados por los reactivos de
45 detección de dianas utilizados en el ensayo.

Dependiendo del molde de compómero incluido en el reactivo de detección de dianas concreto, algunos compómeros pueden inicialmente generarse como parte de precursores más grandes que requieren un procesamiento adicional antes de la detección del compómero. La invención se refiere a dichos precursores. Dichos precursores, denominados "sustratos de escisión", comprenden al menos dos especies de subunidades
50 monoméricas diferentes y contienen al menos dos regiones, un compómero y otra región que se puede separar del compómero antes de la detección. Cuando se emplean sustratos de escisión, la parte de compómero carece preferiblemente de al menos una especie de subunidad monomérica que se encuentra en la molécula precursora más grande. De forma alternativa, un sustrato de escisión, o una pluralidad de sustratos de escisión, puede incluir un elemento tal como un sitio de escisión de una endopeptidasa. Según el caso, la parte terminal del sustrato de escisión se escinde preferiblemente para liberar el compómero, la presencia del cual se puede detectar a
55 continuación. Un compómero se puede liberar desde un sustrato de escisión, por ejemplo, mediante escisión química, física, o enzimática. Preferiblemente, la escisión es específica de la subunidad y está dirigida a una o más de las especies de subunidades ausentes en la parte de compómero del sustrato de escisión. La separación de un compómero procedente de un precursor más grande asegura que los compómeros generados en un ensayo
60 concreto presentarán la característica definida que permite su posterior detección y correlación con la molécula diana correspondiente. La región escindida procedente de un sustrato de escisión para dar como resultado un compómero contiene al menos una parte de una subunidad monomérica. Cuando la región escindida comprende

más de una subunidad monomérica, las subunidades pueden, por ejemplo, ser de la misma o de diferentes especies, siendo al menos una de ellas una especie diferente de la especie de subunidad monomérica presente en el compómero. En otras realizaciones, la región escindida puede contener una o más subunidades de la misma especie que comprende el compómero. En la divulgación, el compómero no se genera como parte de un precursor más grande. En vez de esto, la síntesis a partir del molde de compómero (o de los compómeros intermedios) da como resultado de forma directa el compómero concreto, exento de cualquier parte que deba eliminarse antes de la detección.

En la divulgación, los compómeros comprenden normalmente de una a aproximadamente 1000 subunidades monoméricas (*por ejemplo*, subunidades de nucleobases individuales (particularmente ribonucleótidos), aminoácidos, *etc.*), aunque se pueden utilizar también subunidades más grandes comprendidas por varias subunidades monoméricas, particularmente cuando se emplean químicas de polimerización no enzimáticas. Se prefieren particularmente los compómeros que comprenden de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, 20, 50 y 100 unidades monoméricas. En la invención en la que diversas especies de compómeros se liberarán procedentes de los sustratos de escisión correspondientes antes de la detección, se prefiere que las regiones de compómero se genomanipulen para comprender unas pocas de todas las especies de subunidades que se puede usar en una reacción dada. En la invención, cuando se sintetiza enzimáticamente un sustrato de escisión a partir de ribonucleótidos, la parte de compómero comprende solo una, dos o tres especies de subunidades (aquí, ribonucleótidos), conteniendo el resto de la(s) parte(es) del sustrato de escisión una o más subunidades al menos una de las cuales no está presente en el compómero y que se puede usar de esta manera para liberar el compómero procedente del sustrato de escisión. Por supuesto, en algunas realizaciones que emplean un sustrato de escisión, en las que no es necesario que el compómero contenga más que unas pocas especies de la subunidad que las contenidas en el precursor, se pueden emplear también como técnicas que se basan en la presencia de dos o más subunidades específicas para efectuar la liberación. Por ejemplo, se puede genomanipular un sustrato de escisión basado en péptidos para incluir una secuencia de aminoácidos que se escinda de forma específica por una proteasa. En dichas realizaciones, la escisión proteolítica separa el compómero del resto del sustrato de escisión.

Como las especies de compómeros individuales se han modificado por ingeniería genética, para tener una característica definida, la masa (o el intervalo de masas), que permite distinguir una especie de compómero del resto de especies de compómeros que se pueden generar en un ensayo, se prefiere que la característica definida de una especie de compómero concreta se defina estrechamente. En la invención, la característica definida es la masa, una definición estrecha de la masa significa que la masa, y más probablemente el intervalo de masas de la especie (debido a la variación isotópica entre los átomos que conforman las moléculas de una especie de compómero concreta) es estrecho. Para minimizar el intervalo de masas de una especie de compómero, como se prefiere de forma particular en ensayos muy multiplexados que emplean sistemas de detección basados en masas (*por ejemplo*, espectrómetros de masas), el compómero (o los sustratos de escisión) se pueden generar utilizando subunidades que están isotópicamente definidas. Por supuesto, puesto que las subunidades isotópicamente definidas pueden ser más costosas de procurar que los reactivos comparables comprendidos por átomos que no se han enriquecido o agotado para un isótopo concreto, en dichas realizaciones se prefiere que los sustratos de escisión incluyan tan pocas subunidades como sea posible (preferiblemente no más de aproximadamente 100, preferiblemente menos de aproximadamente 25, y preferiblemente 0, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1) fuera de las regiones del compómero.

Puesto que los compómeros se han modificado por ingeniería genética en términos de secuencia y/o composición de la subunidad para proporcionar una masa definida, se pueden generar, si se desea, muchas especies de compómeros diferentes en un ensayo dado. El número máximo de especies de compómeros que se pueden usar en un ensayo dado dependerá de muchos factores, incluyendo la composición de la subunidad de los compómeros, tanto si alguno como si todos los compómeros se definen isotópicamente (en el que la masa es la característica definida), el sistema de detección empleado, el intervalo de masas que se pueden detectar de manera precisa mediante el sistema de detección empleado (en el que la masa es la característica definida), la sensibilidad del detector usado, el software usado para analizar los datos resultantes, el número de especies de moléculas diana que se está analizando, *etc.*

En la invención, la masa es la característica definida usada para distinguir las especies de compómeros. Como resultado, en dichas realizaciones los compómeros se detectan normalmente utilizando técnicas de detección basadas en la masa, prefiriéndose la espectrometría de masas. Aunque se prevé que se pueda usar cualquier procedimiento de espectrometría de masas conocido para detectar compómeros, los procedimientos preferidos son espectrometría de masas con ionización por desorción con láser directo (sin matriz), espectrometría de masas con ionización por electropulverización, y se prefieren la espectrometría de masas de átomos neutros secundarios, y la espectrometría de masas de iones secundarios.

Como se apreciará, se puede diseñar una pluralidad de especies de compómeros diferentes y a continuación codificarse en bibliotecas de moldes de compómeros con factores tales como el sistema de detección a usar en un ensayo dado, el número de especies de moléculas diana que se pueden detectar en un ensayo dado (y de esta manera el nivel de multiplexación), cualquier subunidad isotópicamente definida está disponible para sintetizar compómeros (en el contexto de los ensayos que emplean detección de masas para detectar los compómeros), *etc.*, el número de moldes de compómeros en una biblioteca dada puede diferir. Preferiblemente, en una biblioteca dada las diferentes especies de moldes de compómeros se diseñarán para guiar la generación de especies de

compómeros que se pueden resolver fácilmente mediante el sistema de detección particular que se va a emplear. En muchas realizaciones, los moldes de compómeros codificarán los sustratos de escisión. Puesto que la secuencia de subunidades de un compómero dado es independiente de la identidad de la diana, se puede usar el mismo conjunto de compómeros para detectar diferentes conjuntos de moléculas diana, ya que el resto de unión a la diana de un reactivo de detección de dianas dado determina la especificidad de la diana. De esta manera, se pueden ensamblar diferentes bibliotecas de reactivos de detección de dianas utilizando una única biblioteca de moldes de compómeros, o una parte de la misma, unida a diferentes bibliotecas de restos de unión a diana. Tal como se apreciará para una biblioteca de un reactivo de detección de dianas concreto, se conocen los componentes de cada especie de reactivo de detección de dianas, lo que permite correlacionar las especies de compómeros con las dianas, de tal manera que la detección de un compómero codificado por un reactivo de detección de dianas concreto señala indirectamente la presencia en la muestra de la diana reconocida por el reactivo de detección de dianas. Los moldes de compómeros, solos o ensamblados en los reactivos de detección de dianas, se pueden envasar y comercializar como kits. Dichos kits pueden incluir múltiples moldes de compómeros o especies de reactivos de detección de dianas. Cuando se envasa una pluralidad de diferentes especies, en algunas realizaciones, se pueden envasar individualmente, mientras que en otras, algunas o todas ellas se pueden envasar por separado. Además, los moldes de compómeros y los reactivos de detección de dianas se preparan preferiblemente como reactivos purificados aislados, y se pueden almacenar en forma líquida o sólida.

Otro aspecto de la invención se refiere a los procedimientos para preparar compómeros utilizando los moldes de compómeros de la invención. En dichos procedimientos, después que un resto de unión a la diana de un reactivo de detección de dianas se une a su molécula diana correspondiente para formar un complejo reactivo:diana, el molde de compómero se usa para generar el compómero (o el sustrato de escisión) codificado por la región del mismo que codifica el compómero. En algunas realizaciones, el reactivo de detección de dianas puede incluir además uno o más restos de etiquetas, cuyos restos se pueden usar para purificar, aislar, o separar complejos reactivo:diana (y moléculas de reactivos de detección de dianas sin reaccionar) procedentes de otros componentes en un ensayo, incluyendo los reactivos de detección de dianas que no han reaccionado con las moléculas diana.

En realizaciones en las que el reactivo de detección de dianas incluye un complemento de un molde de compómero, el molde de compómero se produce antes de la generación del compómero. En algunas realizaciones preferidas, el molde de compómero comprende una unidad de transcripción, y por tanto, el compómero codificado se genera transcribiendo la región codificadora del compómero utilizando una ARN polimerasa (preferiblemente una ARN polimerasa dependiente de ADN) que puede dirigir la transcripción de ácidos nucleicos asociados funcionalmente con el promotor concreto incluido en la unidad de transcripción. En otras realizaciones que no implican la transcripción, por ejemplo, la extensión del cebador o la polimerización de la subunidad utilizando el molde de compómero como una guía, se proporcionan las condiciones de reacción adecuadas para permitir la generación del compómero (o el sustrato de escisión). En la invención en la que el molde de compómero codifica un sustrato de escisión, tras la generación del sustrato de escisión, el compómero se separa preferiblemente de las subunidades adicionales incluidas en el sustrato de escisión que no constituyen una parte del compómero.

Como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, la presente invención proporciona un aumento de la precisión, eficacia, y fiabilidad de los procedimientos diseñados para detectar de forma indirecta la presencia de una o más especies de la molécula diana en una muestra, particularmente en un complejo de muestras tales como las muestras biológicas obtenidas de pacientes, *por ejemplo*, a fines de cribado diagnóstico o pronóstico. Preferiblemente, los ensayos llevados de acuerdo con la invención emplean uno o más controles para reducir el riesgo de resultados falsos negativos o falsos positivos. Se pueden llevar a cabo también los procedimientos de la presente invención rápidamente (*por ejemplo*, en tan poco como aproximadamente 2-3 horas), y de manera económica, de tal manera que no se requieren reactivos especializados (diferentes de los reactivos de detección de dianas de acuerdo con la invención). Por tanto, encontrarán una extendida aplicación en las ciencias biológicas. De esta manera, otros aspectos de la invención se refieren a las aplicaciones para los procedimientos de la invención. Como se apreciará, los procedimientos que se pueden usar para muchos fines, incluyen el diagnóstico (*por ejemplo*, prenatal o postnatal) de una enfermedad genética, una predisposición genética a una enfermedad o dolencia (por ejemplo, obesidad, aterosclerosis, o cáncer), infección por un patógeno (*por ejemplo*, un virus, bacterias, parásitos, u hongos), o para proporcionar información relacionada con la identidad, herencia (*por ejemplo*, paternidad), compatibilidad (*por ejemplo*, fenotipado de HLA para fines de trasplante de tejidos), o sensibilidad a un fármaco o régimen terapéutico propuesto.

El resumen de la invención descrito anteriormente, es no limitante y otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras, de la descripción detallada de la invención, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos y realizaciones de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La Figura 1 ilustra mediante un diagrama la estructura general de un reactivo de detección de dianas de acuerdo con la invención. Tal como se muestra, un reactivo de detección de dianas comprende un molde de compómero (MC) vinculado a un resto de unión a la diana (RUD). El enlace MC-RUD (X) puede ser directamente entre grupos reactivos en el molde de compómero respectivo y porciones del resto de unión a la diana o por medio de una molécula enlazadora (o grupo de moléculas) dispuesta entre el molde de compómero y el resto de unión a la diana. Preferiblemente, los enlaces entre los diversos componentes son covalentes.

La Figura 2 ilustra mediante un diagrama la estructura general de un molde de compómero de un reactivo de detección de dianas de la invención. En esta ilustración representativa, el molde de compómero comprende una región codificadora del compómero y un terminador, aunque se entiende que la región terminadora es un elemento opcional. Cuando se incluye, la región terminadora permite una estricta definición del término en última instancia del compómero codificado. Los ejemplos de regiones terminadoras incluyen aquellas que comprenden las subunidades terminadoras de la cadena (tales como las subunidades adicionales que no se pueden añadir al compómero nascente, el sustrato de escisión, u otro intermedio más allá de la subunidad de terminación de la cadena, por ejemplo, un dideoxinucleótido), las bases de escisión, etc. Preferiblemente, cada miembro de la biblioteca de moldes de compómeros que incluye las regiones terminadoras codificará, por tanto, el mismo terminador, por ejemplo, facilitando la eliminación de las regiones terminadoras mediante, por ejemplo, la escisión de una base de escisión. Los moldes de compómeros están comprendidos por subunidades que se pueden polimerizar utilizando la química adecuada, que incluye procedimientos enzimáticos. Las subunidades del molde de compómero sirven como un molde para generar un compómero que tiene características definidas.

La Figura 3 ilustra mediante un diagrama determinadas realizaciones preferidas de moldes de compómeros de acuerdo con la invención. En esta realización, el molde de compómero puede incluir opcionalmente un terminador, así como una región antes de la región que codifica el compómero, que en la figura se designa "Y". Cuando se incluye, la región Y incluye también una o más subunidades, por ejemplo, subunidades de nucleobases. Estas subunidades adicionales, si está presente una región Y, son preferiblemente del mismo tipo que las subunidades de la región que codifica el compómero (por ejemplo, subunidades de nucleótidos cuando la región que codifica el compómero comprende subunidades de nucleobases). Como se apreciará, las diferencias entre las regiones de definición del compómero en diversos moldes de compómeros distinguen unas especies de otras, y en última instancia permiten por tanto a las diferentes especies de compómeros codificadas distinguirse entre sí.

La Figura 4 representa mediante un diagrama un tipo preferido de moldes de compómeros de acuerdo con la invención que desarrollan los ilustrados en la Figura 3. Aquí, se representa gráficamente un elemento adicional, un promotor – o región codificadora de un sitio de unión a un cebador (o regiones que incluyen un sitio de unión a cebador y un promotor). En aquellas realizaciones en las que el molde de compómero codifica un promotor, si es necesario, el molde codifica también las secuencias adicionales requeridas en última instancia para el inicio de la transcripción (aquí, designadas como la región "Y").

La Figura 5 ilustra las realizaciones preferidas de fórmulas para moldes de compómeros de acuerdo con la invención que son similares a las que se muestran en la Figura 3, siendo la diferencia que en esta figura, la región de definición del compómero se define para comprender 1-5 ejemplos de una secuencia de la subunidad de nucleobases definida por la fórmula $A_xC_yG_z$, en la que x varía entre 0-5 e y, y z varían cada uno de forma independiente entre 0 y 10.

La Figura 6 ilustra un ejemplo representativo que ilustra el ensamblaje de una pluralidad de diferentes especies de reactivo de detección de dianas procedentes de miembros de componentes de bibliotecas ya existentes. Tal como se representa gráficamente en esta figura, la biblioteca de moldes de compómero individuales contiene moldes de compómeros de las especies 1, 2, 3, a n (MC1, MC2, MC3, hasta MCn), la biblioteca 1 de restos de unión a diana contiene x especies de restos de unión a diana (numerados RUD1-1, RUD1-2, RUD1-3, a RUD1-x), cada uno de los cuales se dirige a un ácido nucleico diana diferente (*por ejemplo*, variaciones genéticas diferentes) y una biblioteca 2 de restos de unión a diana contiene y especies de restos de unión a diana (numerados RUD2-1, RUD2-2, RUD2-3, a RUD1-y), cada uno de los cuales se dirige a diferentes especies de polipéptidos, por ejemplo, una proteína asociada a enfermedad. Cuyos restos de unión a diana incluidos en las cinco especies de reactivos de detección de dianas muestran dependencia de las moléculas diana que se van a detectar en el ensayo concreto. Aquí, cuatro de las especies de moléculas diana son ácidos nucleicos, mientras que la quinta especie es un polipéptido. Tras la decisión de cuál de los restos de unión a diana se va a usar (basándose en las dianas específicas que se van a evaluar), se tomó una decisión sobre cuál molde de compómero usar, y si se usará un enlazador (L) para unir un molde de compómero dado al resto de unión a la diana que se ha asignado. A continuación se ensamblaron los cinco reactivos de detección de dianas (TDR1-5). Así como las características definidas de una especie de compómero individual no dependen de la identidad de una diana concreta, se pueden ensamblar los moldes de compómeros con restos de unión a diana, sin tener en cuenta la secuencia diana, la estructura, o similar. Sin embargo, el ensamblaje de un molde de compómero concreto y de un resto de unión a la diana concreto en un reactivo de detección de dianas da como resultado que el compómero llegue a correlacionarse con la diana concreta, y viceversa.

La Figura 7 ilustra de forma esquemática algunas realizaciones particularmente preferidas de los moldes de compómero de acuerdo con la invención. En cada una de estas realizaciones, el molde de compómero codifica un promotor (un promotor T7 en tres de los moldes de compómeros y un promotor SP6 en los otros tres moldes de

compómeros), un codón de inicio de la transcripción (es decir, las regiones en las diversas especies de compómeros genomanipuladas para permitir la distinción de la especie de compómero durante la etapa de detección del análisis concreto), y una base de escisión. Dichos moldes de compómeros, y los componentes que codifican, proporcionan niveles extremadamente elevados de multiplexado, particularmente cuando se acoplan con sistemas de detección MALDI. En las realizaciones ilustradas en esta figura, cada compómero comprende de una a tres especies de subunidades de nucleótidos diferentes, comprendiendo la base de escisión una subunidad de nucleótidos no representada en la región del compómero. En cada compómero, k, x, y, y z son enteros que se seleccionan de forma independiente entre 0 y 1.000 o más, normalmente 0-100, preferiblemente 0-50, con la comprensión de que dentro de una biblioteca dada, la región de especificidad del compómero de cada especie de molde de compómero (y de esta manera, el compómero codificado) diferirá de la de las otras especies en la biblioteca. La figura ilustra también que en determinadas realizaciones preferidas, se pueden genomanipular los compómeros resultantes para contener las subunidades modificadas por la masa (ilustradas de forma representativa aquí por restos C metilados, "C^{mes}").

La Figura 8 representa gráficamente un conjunto de especies de reactivos de detección de acuerdo con la invención, cada uno de los cuales comprende un primer y un segundo oligonucleótidos. Tal como se muestra en este ejemplo, se pueden usar dos especies del primer oligonucleótido para distinguir una única transición de nucleótidos (*es decir*, la diferente entre A o G en una posición de los nucleótidos concreta en un ácido nucleico diana) en un ADN genómico. Cuyo alelo (que contiene A o G), o alelos, se puede determinar que está presente en una muestra dada uniendo la subunidad 5' del segundo oligonucleótido con la subunidad 3' del primer oligonucleótido que es complementaria tanto con A como con G que contiene el alelo. Cuando el primer y el segundo oligonucleótidos se unen (*por ejemplo*, mediante ligadura), el reactivo de detección de dianas resultante se puede amplificar usando una pareja de cebadores universales que es complementaria con los sitios de unión del cebador (designados "Cebador 2 Universal" y "Cebador 1 Universal" presentes en el reactivo de detección de dianas).

La Figura 9A muestra el espectro de masas simulado que se puede obtener detectando los compómeros generados en un ensayo de acuerdo con la invención utilizando, por ejemplo, espectrometría de masas TOF axial lineal. Tal como se muestra en este ejemplo representativo, se pueden sintetizar fácilmente 85 compómeros (las fórmulas, longitudes, y masas de los cuales se muestran en la Figura 9B) procedentes de ribonucleótidos que tienen una distribución isotópica, normal, o natural. Las especies de compómeros representadas en esta biblioteca a modo de ejemplo pueden representarse por la fórmula: (rA_xrG_y)_zrC_t, en la que z está entre 3 - 30 y z = x + y. esta especie de compómero comprende cualquiera de las subunidades rA y rG, y cada especie incluye una base de escisión (aquí, una única rC en el término 3' de cada compómero, cuya escisión puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante la digestión con la ARNasa A. Se pueden generar compómeros basados en ARN, tales como los representados gráficamente en este ejemplo, por ejemplo, mediante la transcripción de los moldes de escisión correspondientes en una reacción de transcripción in vitro. Tal como se ha indicado, la biblioteca de compómeros de 85 miembros ilustrada aquí se diseñó para la detección mediante espectrometría de masas TOF axial lineal utilizando una ventana de masas de 2500 Da a 10000 Da, con una resolución de masa (m_r) de 450 a 1500 Da, 650 a 4000 Da, y 850 a 6000 Da. En el diseño de la biblioteca, se consideraron las posiciones de los aductos salinos (Na y K⁹, y se genomanipuló la biblioteca, para excluir los compómeros que tenían aductos salinos con masas suficientemente similares a otras especies de compómeros en las que se podría producir una interpretación incorrecta de los resultados. Se consideraron también las señales de masa con carga doble, y se excluyeron también las especies de compómeros que tenían masas potencialmente erróneas puesto que se excluyeron también de la biblioteca durante la fase de diseño.

La Figura 10 ilustra un tipo de reactivo de detección de dianas en el que el resto de unión a la diana comprende un anticuerpo, cuyo anticuerpo se une al molde de compómero. Dicha unión puede implicar un enlazador, y es preferiblemente covalente. Se muestran también las realizaciones en las que el reactivo de detección de dianas codifica uno (panel B) o dos (panel C) sitios de unión a cebador, cuyos sitios se pueden usar para amplificar los moldes de compómeros adyacentes al anterior antes de la generación de los compómeros codificados (o los sustratos de escisión).

Descripción detallada

De forma amplia, la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones proporciona procedimientos para detectar de manera indirecta una o más especies de moléculas diana concretas, tales como una especie de polipéptido o ácido nucleico concreta, en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. Una especie concreta de la molécula diana se detecta de forma indirecta detectando un compómero que está correlacionado de manera específica con la especie de molécula diana. Los compómeros son polímeros lineales comprendidos por subunidades de ribo nucleótidos, y se generan a partir de moldes unidos a moléculas específicas de la diana que se unen de forma específica a la molécula diana. Para facilitar el análisis en paralelo de múltiples especies de moléculas diana en un único ensayo, las especies de compómeros se diseñan para ser distinguibles entre sí. Se proporciona un reconocimiento por separado mediante una o más características definidas, cuyas características difieren entre las especies de compómeros. Las características del compómero se definen mediante la masa molecular. Se emplea un sistema adecuado para la detección del compómero.

Los compómeros de la presente invención son útiles para detectar de forma indirecta la presencia de una amplia variedad de moléculas diana, prefiriéndose de forma particular las dianas biomoleculares. Los ejemplos

representativos de biomoléculas cuya presencia en una muestra se puede señalar mediante un compómero incluyen la detección de secuencias génicas, alelos, variantes alélicas, secuencias de nucleótidos no codificantes, mutaciones con un gen o una secuencia de una proteína, metales, toxinas, polipéptidos, hidratos de carbono, y lípidos.

- 5 La siguiente descripción comienza con una discusión de las técnicas de preparación de muestras representativas, seguida por una descripción detallada representativa y no limitante de los reactivos y procedimientos de la invención.

A. Muestras. Preparación de la muestra

10 La presente invención proporciona una detección simultánea eficaz de una o más moléculas diana en una única muestra. Las muestras que se pueden analizar de acuerdo con la invención incluyen muestras ambientales, que pueden incluir o no material biológico. Las muestras particularmente preferidas son muestras biológicas conocidas o sospechosas de contener especies de biomoléculas de interés. Se pueden obtener las muestras para análisis a partir de cualquier fuente adecuada. Tras obtener una muestra, esta se procesa utilizando cualquier técnica adecuada para preparar las moléculas diana que se van a detectar, si están presentes en la muestra o en una alícuota de la misma, accesibles para la interacción con los reactivos de detección de dianas de la invención.

15 En el contexto de las muestras biológicas que pueden contener una o más moléculas diana de interés, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, metales, toxinas, e hidratos de carbono, se pueden obtener las muestras a partir de cualquier fuente conocida o sospechosa de contener la especie de biomolécula diana que se va a detectar. Dichas muestras pueden prepararse de materiales sólidos, tales como tejido, aglomerados de células, y biopsias, así como de líquidos. Las muestras de fluidos biológicos incluyen orina, sangre, saliva, fluido amniótico, enjuagues bucales, linfa, sudor, esputo, moco, lágrimas, etc. Las muestras biológicas incluyen también aquellas tomadas de cultivos celulares, etc.

Las muestras biológicas se pueden obtener de cualquier organismo vivo o muerto. Los ejemplos representativos incluyen plantas y animales, así como células y tejidos derivados de los anteriores. Se cree que la presente invención encontrará una aplicación particularmente amplia en la medicina humana y animal.

25 Se pueden preparar muestras biológicas para análisis utilizando, si se desea, cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, los procedimientos de cri congelación y de lisis alcalina pueden ser útiles para obtener moléculas de ácidos nucleicos a partir de células en orina, y se puede usar la extracción de la proteinasa K para obtener ácido nucleico de las células sanguíneas. Se conocen en la técnica otros procedimientos adecuados, y se pueden adaptar fácilmente para el uso en la práctica de la presente invención dependiendo de las especies de moléculas diana que se van a detectar y del tipo de muestra que se va a obtener. Si se desea, se pueden emplear una o más etapas de purificación y concentración en el procedimiento de preparación de la muestra para purificar y/o concentrar inicialmente el(los) tipo(s) de moléculas diana que se van a detectar. Por ejemplo, se pueden aislar ácidos nucleicos a partir de desechos celulares mediante precipitación utilizando cualquiera de numerosos reactivos adecuados conocidos en la técnica. Se pueden aislar otros componentes celulares utilizando procedimientos de fraccionamiento adecuados.

40 Para obtener una cantidad suficiente de moléculas diana, particularmente moléculas de ácido nucleico diana, para análisis, puede ser deseable llevar a cabo una amplificación inicial que puede ser necesaria. Los ejemplos de procedimientos de amplificación adecuados para uso en la invención incluyen: clonación (véase, por ejemplo, Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véanse, por ejemplo C. R. Newton y A. Graham, PCR, BIOS Publishers, 1994; Patentes de los Estados Unidos N^{os}. 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; 5.468.613; 5.604.099; 5.656.493; 6.040.166; y 6.514.736), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse, por ejemplo, Wiedmann, y col., (1994) PCR Methods Appl., vol. 3: 57-64; Barnay, F. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88: 189-93; patentes de los Estados Unidos N^{os}. 5.869.252 y 6.368.801), amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) (véanse, por ejemplo., Walker, y col. (1994), Nucleic Acids Res., vol. 22: 2670-77; Patente de los Estados Unidos N^o. 5.455.166) y variaciones tales como RT-PCR (véase, por ejemplo, Higuchi, y col. (1993), Bio/Technology, vol. 11: 1026-1030), Amplificación específica de alelo (ASA), amplificación mediante la replicasa Q-beta (Lizardi, y col. (1992), Bio/Technology, vol. 6: 1197-1202), y procedimientos basados en la transcripción (véanse, por ejemplo las Patentes de los estados unidos N^{os}. 5.480.784; 5.824.518; 6.087.133; y 6.214.587).

50 Para facilitar el análisis, se pueden inmovilizar las moléculas diana en un soporte sólido, aunque se prefieren los procedimientos basados en solución. Los ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen perlas (*por ejemplo*, perlas de gel de sílice, perlas de vidrio de poro controlado, perlas magnéticas, perlas de Sefadex/Sefarosa, perlas de celulosa, etc.), revestidas y no revestidas de nanopartículas, superficies planas o chips (*por ejemplo*, filtros de fibra de vidrio, superficies de vidrio, superficies metálicas (*por ejemplo*, acero, oro, plata, aluminio, cobre, etc.), capilares, plástico (*por ejemplo*, polietileno, polipropileno, poliamida, membranas de fluoruro de polivinilideno, y placas de microtitulación)); o peines o cepillos preparados de materiales similares que comprenden superficies planas o perlas colocadas en pozos en superficies planas tales como obleas (*por ejemplo*, obleas de silicio).

La inmovilización de la molécula diana se lleva a cabo preferiblemente cuando se desea o es necesario eliminar de

un ensayo los reactivos de detección de dianas que no se han unido a la molécula diana para la cual son específicos antes de la síntesis del compómero (o del sustrato de escisión). En las realizaciones preferidas, las moléculas diana se inmovilizan sobre un soporte sólido utilizando reactivos de captura adecuados. Por ejemplo, reactivos de captura adecuados para el uso en el contexto de moléculas diana basadas en ácidos nucleicos que incluyen oligonucleótidos unidos a un soporte sólido. Preferiblemente, dichos oligonucleótidos se hibridan a las moléculas de ácidos nucleicos diana en una región próxima a la secuencia del nucleótido diana. Después que se han capturado las moléculas de ácidos nucleicos, se pueden añadir uno o más reactivos de detección de dianas a la reacción. Aquellos que se hibridan a sus respectivas secuencias diana se retienen, mientras que aquellos que no se hibridan se pueden lavar de nuevo. Posteriormente, se pueden generar compómeros y detectarse.

B. Reactivos de detección de dianas

Los reactivos de detección de dianas se usan para detectar las moléculas diana de interés que están presentes en una muestra. Los reactivos de detección de dianas son moléculas sintéticas que incluyen un resto de unión a la diana y un molde de compómero (o su complemento), tal como se muestra en la Figura 1. Los restos de unión a diana y los moldes de compómeros se pueden sintetizar en una única reacción, o se pueden unir combinando dos o más subunidades sintetizadas en diferentes reacciones. En las realizaciones preferidas, los restos de unión a diana y los moldes de compómeros se sintetizan por separado, tras de los cual se pueden unir cuando y como se desee. La orientación relativa del molde de compómero con respecto a los restos de unión a diana se deja a la discreción del técnico experto, y dependerá de la aplicación concreta. Las orientaciones representativas de los reactivos de detección de dianas comprendidos por componentes de ácidos nucleicos incluyen aquellos en los que el molde de compómero se dispone 5' o 3' al resto de unión a la diana. De forma similar, se pueden incluir y disponer otros componentes opcionales, por ejemplo, sitios de unión a cebador (o los complementos del mismo) y disponerse en la dirección 5' o 3' (por ejemplo, 5' o 3', respectivamente), en el caso de componentes basados en ácidos nucleicos) de un resto de unión a la diana y/o un molde de compómero.

Puesto que los compómeros son independientes de la secuencia o la estructura de una molécula diana, se puede unir una única biblioteca de moldes de compómeros optimizados (o un subconjunto de la misma) que produce compómeros optimizados para la detección mediante un sistema de detección particular (*por ejemplo*, espectrometría de masas MALDI) a muchos tipos diferentes de restos de unión a diana, por ejemplo, aquellos preparados a partir de ácidos nucleicos y polipéptidos (*por ejemplo*, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos). Como se apreciara, se puede unir directamente un molde de compómero a un resto de unión a la diana. De forma alternativa, los moldes de compómeros y los restos de unión a diana se pueden unir mediante un enlazador. Preferiblemente, el molde de compómero-resto de unión a la diana se une covalentemente, aunque también se pueden emplear enlaces no covalentes mediados, por ejemplo, por parejas de unión de elevada afinidad (*por ejemplo*, estreptavidina y biotina, anticuerpo y antígeno, receptor y ligando, *etc.*).

Los restos de unión a diana contienen uno o más grupos reactivos, cada uno de los cuales es específico de una especie concreta de molécula diana (*por ejemplo*, un alelo o polipéptido concreto) aunque dos grupos reactivos pueden ser específicos de la misma molécula diana, aunque en diferentes regiones. Por ejemplo, se pueden sensibilizar diferentes anticuerpos frente al mismo polipéptido, dirigiéndose cada especie diferente a un epítipo diferente. De forma alternativa, dos oligonucleótidos que se dirigen de forma independiente a diferentes regiones del mismo gen, por ejemplo, a diferentes alelos o diferentes regiones dentro del mismo alelo. En el contexto de la detección del ácido nucleico, los restos de unión a diana preferidos son oligonucleótidos específicamente reactivos con, y de esta manera son capaces de hibridarse de forma selectiva a, secuencias de ácidos nucleicos diana en las moléculas de ácido nucleico de interés. Además de los péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, y similares, otros tipos de restos de unión a diana incluyen aptámeros y pequeñas moléculas.

Con respecto a la detección de moléculas diana no de ácido nucleico, el reactivo de detección de dianas contiene normalmente al menos un grupo reactivo que comprende un polipéptido, preferiblemente un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (*es decir*, la parte reactiva al antígeno), un receptor, un ligando de una molécula diana que es un receptor, o un polipéptido específico de diana derivado de un procedimiento basado en la expresión in fago. Dichas moléculas de unión a diana basadas en polipéptidos se pueden obtener de cualquier fuente de organismos adecuada, y se pueden sintetizar utilizando cualquier técnica adecuada. Se prefieren particularmente los restos de unión a diana derivados de la misma especie de planta o animal que la molécula diana que se va a detectar. También, para polipéptidos que contienen más de aproximadamente 25 restos de aminoácidos, dichas moléculas se sintetizan preferiblemente utilizando técnicas recombinantes, mientras que los polipéptidos más cortos se sintetizan preferiblemente utilizando una química del estado sólido.

En otras realizaciones, particularmente aquellas en las que la molécula diana es un ácido nucleico, o un polipéptido que se une específicamente a ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos específica, el grupo reactivo del reactivo de detección de dianas comprende una molécula de ácido nucleico diana (*por ejemplo*, un oligonucleótido) que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos diana en la molécula de ácido nucleico diana o, en algunas realizaciones, una proteína de unión a ácido nucleico. En algunas realizaciones, el resto de unión a la diana está comprendido por dos moléculas que se unen específicamente de manera adyacente entre sí en la secuencia de nucleótidos diana de la molécula diana. Preferiblemente, las moléculas se unen a la diana de tal manera que el nucleótido del extremo 3' de una molécula se yuxtapone al nucleótido del extremo 5' de

la otra molécula de tal manera que se puede unir, preferiblemente, mediante una enzima ligasa, para formar una única molécula que comprende el resto de unión a la diana del reactivo de detección de dianas concreto

Independientemente del (de los) grupo(s) reactivo(s) (es decir, el(los) resto(s) de unión a diana)) incluido(s) en un reactivo de detección dado, el reactivo incluye también al menos un molde de compómero. Un molde de compómero, o su complemento, codifica mínimamente el compómero que se puede generar en las condiciones adecuadas. Los moldes de compómeros codifican una unidad de transcripción que dirige la expresión del compómero codificado, mediante la transcripción, en el que el compómero comprende ribonucleótidos. En la divulgación, el molde de compómero sirve como el molde para la posterior síntesis del compómero, por ejemplo, mediante la extensión del cebador.

El molde de compómero es un ácido nucleico monocatenario, normalmente un oligonucleótido, que comprende una secuencia genomanipulada de nucleótidos, nucleósidos, u otras subunidades monoméricas que contienen nucleobases. Si se desea, sin embargo, el molde de compómero puede ser una molécula bicatenaria, en cuyo caso, los procedimientos y reactivos empleados se adaptan de acuerdo con esto. Como se apreciará, se pueden usar también soluciones no enzimáticas para generar compómeros a partir de un molde de compómero, en cuyo caso los componentes del molde de compómero no necesitan genomanipularse para proporcionar la capacidad de la transcripción mediante una ARN polimerasa.

El molde de compómero codifica una unidad de transcripción, la unidad de transcripción codifica mínimamente una región promotora y una región codificadora del compómero. La transcripción de la unidad de transcripción da como resultado la producción de un compómero, o de una molécula de ARNm que se puede traducir para generar un compómero basado en aminoácidos. La región que codifica el compómero de una unidad de transcripción codifica uno o más nucleótidos adicionales además de comprender el compómero (o una molécula de ARN que se puede traducir para generar el compómero). Dichas moléculas precursoras más grandes, o sustratos de escisión, pueden a continuación tratarse química o enzimáticamente para liberar el compómero concreto.

Cuando los compómeros se sintetizan como parte de los sustratos de escisión, el precursor más grande se genomanipula para facilitar la posterior liberación del compómero, por ejemplo, mediante escisión química, física, o enzimática. Aunque se puede llevar a cabo la liberación del compómero mediante cualquier procedimiento conocido, se prefiere actualmente que una, varias, o muchas especies de compómeros se liberen de forma simultánea tratando la reacción con uno o más reactivos (preferiblemente una única especie de reactivo), que escinde de forma específica las especies de los sustratos de escisión en o dentro de una subunidad fuera de las porciones de compómeros de los precursores más grandes. Como se apreciará, el grupo de escisión puede ser cualquier grupo lábil que proporciona la liberación de un compómero procedente de un sustrato de escisión. El grupo de escisión puede de esta manera ser un enlace escindible químicamente o un enlace químico lábil y se puede situar en cualquiera de ambos extremos de un compómero. Dichos enlaces pueden escindirse normalmente mediante procedimientos que son bien conocidos de los expertos en la técnica, tales como mediante la química de ácidos, bases, oxidación, reducción, calor, luz, catalizada por iones metálicos, desplazamiento o eliminación. Por supuesto, se puede producir la escisión en una subunidad que incluye grupos o enlaces escindibles por una enzima. Los grupos de liberación escindibles enzimáticamente incluyen enlaces fosfodiéster o amida así como sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción.

En el caso de sustratos escindibles basados en polinucleótidos monocatenarios, se puede llevar a cabo la escisión del compómero, por ejemplo, incluyendo una o más especies de subunidades de nucleobases escindibles no presentes en la parte del compómero en alguna parte en el sustrato de escisión. Tras la generación del sustrato de escisión, el tratamiento con el reactivo de escisión escinde la(s) subunidad(es) previstas para reaccionar con el reactivo de escisión a fin de generar especies de compómeros de la masa esperada. Las condiciones concretas requeridas para la escisión dependerán del reactivo de escisión concreto empleado. En el contexto de compómeros monocatenarios, comprendidos por nucleótidos, los reactivos de escisión adecuados incluyen aquellos que proporcionan una escisión específica de nucleótidos. Los ejemplos de dichos compuestos químicos incluyen aquellos utilizados en las técnicas de secuenciación de Maxam y Gilbert (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol. 74(2): 560-564, 1977), tales como dimetilsulfato, hidrazina, y piperidina. De forma alternativa, se pueden emplear subunidades de nucleobases modificadas (*por ejemplo*, aquellas que contienen grupos metilfosfonato) susceptibles o resistentes a la escisión (sea química, enzimática, o física).

Si se designan uno o más compómeros como ácidos nucleicos bicatenarios, pueden ser preferibles, por otra parte, otros procedimientos de escisión. Por ejemplo, se pueden incorporar uno o más sitios de reconocimiento de la escisión de la endonucleasa de restricción en el sustrato de escisión. Se prefieren particularmente los sitios para la endonucleasa de restricción de tipo II, particularmente aquellos que comprenden un palíndromo de cuatro pares de bases y que dan como resultado productos de escisión enromados. En las realizaciones en las que la escisión mediante una enzima de restricción da como resultado un saliente monocatenario, se puede usar una exonucleasa para eliminar el(los) nucleótido(s) no emparejado(s).

En el contexto de los compómeros monocatenarios preferidos y los sustratos de escisión comprendidos por subunidades que contienen nucleobases, se prefiere que las especies de compómeros (sean una, varias o muchas especies de compómeros sintetizadas en el recipiente de reacción particular como parte de sustratos de escisión

más grandes) que se van a detectar no contengan especies de subunidades de nucleobases escindibles. Como se apreciará, cuando se genera una pluralidad de diferentes compómeros, se prefiere que ninguna de las porciones de compómeros incluya una subunidad de escisión. De esta manera. Solo las especies de subunidades de nucleobases escindibles se escindirán en la reacción de escisión, liberando por tanto los compómeros. Además, solo se necesita usar un reactivo de escisión para efectuar la liberación de todas las diversas especies de compómeros incorporadas en las especies de escisión. Las especies de subunidades de nucleobases escindibles preferidas incluyen adenina, citosina, guanina, hipoxantina, ácido orótico, timina, uracilo, y xantina, e inosina. Cuando una o más subunidades de nucleobases se incorporan en un sustrato de escisión, se pueden escindir mediante tratamiento con una técnica química, enzimática, o física adecuada en las condiciones conocidas en la técnica. en una realización concreta, el enlace químicamente escindible comprende una base modificada, un azúcar modificado, un enlace disulfuro, un grupo químicamente escindible incorporado en la estructura de fosfato de los ácidos nucleicos sintetizados a partir de nucleótidos, u otro enlazador químicamente escindible adecuado. Se conocen bien los grupos químicamente escindibles que se pueden incorporar en las estructuras de fosfato, e incluyen dialcoxisilano, 3'(S)-fosforotioato, 5'(S)-fosforotioato, 3'(N)-fosforoamidato, o 5'(N)-fosforoamidato. En realizaciones adicionales, el enlace químicamente escindible puede ser un azúcar modificado, tal como un resto de ribosa modificado.

Con respecto a los compómeros y a los sustratos de escisión comprendidos por especies de subunidades que no contienen nucleobases, los procedimientos de la divulgación se adaptan de acuerdo con esto. Por ejemplo, en divulgaciones en las que se generan sustratos de escisión comprendidos por aminoácidos (*es decir*, traduciendo un ARNm correspondiente sintetizado a partir de una o más unidades de transcripción diseñadas de forma adecuada), se pueden liberar compómeros mediante cualquier escisión química o enzimática adecuada en un procedimiento adaptado para eliminar las etiquetas de afinidad basadas en péptidos, a partir de las proteínas de fusión. El sistema de escisión particular utilizado dependerá de la escisión concreta deseada. Por ejemplo, en algunas divulgaciones se puede usar un reactivo de escisión que escinde de forma específica una especie de aminoácido no incluida en la parte de compómero de los sustratos de escisión presentes en la reacción. De manera alternativa, se puede diseñar un sitio para la escisión por una exo o endopeptidasa en el sustrato de escisión. Los sitios para la escisión por una endopeptidasa de escisión concreta comprenden normalmente una única secuencia de aminoácidos corta. Se puede usar cualquier sitio o secuencia específica de la proteasa para este fin, y se pueden adaptar fácilmente los reactivos de la invención para el uso de dichas proteasas en la práctica de los presentes procedimientos mediante la incorporación de un sitio de reconocimiento adecuado para la proteasa homóloga. Por ejemplo, se han notificado sistemas que emplean la subunidad catalítica expresada y purificada de forma recombinante de la serina proteasa enterocinasa de bovino (*véase, por ejemplo*, el sitio web de Stratagene Cloning Systems, Inc.), en el que el tratamiento con EK escinde una proteína de fusión inmediatamente después del resto del extremo C del sitio de escisión de cinco restos de la enzima para producir una proteína que tiene una secuencia natural. De acuerdo con esto, el sitio de reconocimiento de la EK se puede genomanipular en un sustrato de escisión de tal manera que el resto de aminoácidos del extremo C del sitio precede de forma inmediata al primer resto de aminoácidos del compómero. Puesto que se conoce, la masa del sitio de reconocimiento escindido (y cualquier resto de aminoácidos adicional que pueda preceder al aminoácido del extremo N de la cita) será fácilmente detectable una señal en el espectro de masas resultante correspondiente al sitio. En reacciones en las que se sintetizan múltiples especies de compómeros y cada una tiene un sitio de escisión, solo un único pico en el espectro resultante será atribuible al fragmento no de compómero escindido.

La divulgación incluye también las realizaciones en las que un reactivo de detección de dianas comprende además una etiqueta (por ejemplo, biotina o digoxigenina) capaz de inmovilizarse sobre un soporte sólido, por ejemplo, la superficie de un recipiente de reacción o una perla o una partícula en solución. Generalmente, la etiqueta es capaz de unirse a o de unirse mediante un compuesto vinculado al soporte sólido. La etiqueta puede unirse al reactivo de detección de dianas directamente, por ejemplo, mediante un enlace químico entre la etiqueta y el soporte sólido, o mediante una molécula enlazadora dispuesta entre la etiqueta y el soporte sólido. Las moléculas de la etiqueta pueden unirse de forma covalente o no covalente al soporte sólido, dependiendo de la molécula de etiqueta utilizada.

La invención abarca también las mezclas que contienen más de un reactivo de detección de dianas dirigido a una región concreta de un locus o polipéptido genético particular. De esta manera, se pueden detectar, por ejemplo, dos o más alteraciones genéticas en una posición de un nucleótido concreto en un gen particular, en una única reacción, en la medida en que cada variante tendrá un compómero diferente correlacionado con este. De forma similar, si la variación genética da como resultado polipéptidos que tienen estructuras variables, dichas variaciones se pueden detectar, por ejemplo, utilizando diferentes especies de anticuerpo (o de fragmentos de anticuerpos) específicos cada uno de una sola de las variantes. Para facilitar la construcción de dichos reactivos de detección de dianas, puede ser deseable sintetizar el resto de unión a la diana en segmento, particularmente en realizaciones en las que la molécula diana es un ácido nucleico. Cuando se sintetiza en fragmentos, un fragmento puede ser invariante, en que la parte del resto de unión a la diana se común a todas las potenciales variantes. El otro segmento, que puede ser tan pequeño como una subunidad que contiene un sola nucleobase, proporciona una discriminación de la variante.

De forma similar, se pueden dirigir diferentes reactivos de detección de dianas a diferentes regiones dentro de un gen concreto. Por ejemplo, si se sabe que tienen varios SNP diferentes en diferentes localizaciones, puede ser

deseable producir uno o más reactivos de detección de dianas específicos de cada posición de SNP.

Aunque menos preferidas, la invención abarca también mezclas en las que un único molde de compómero indica que una de varias dianas ha estado presente en la muestra. Si se desea, se puede determinar en un ensayo posterior que una de las moléculas diana ha estado, de hecho, presente. De forma alternativa, si se detecta una pluralidad de diferentes especies de compómeros, cada uno de los cuales está correlacionado con una o más moléculas diana diferentes, la presencia o ausencia de al menos alguna de las anteriores está correlacionada con la presencia o ausencia de otras moléculas diana que se pueden detectar en el ensayo, se pueden usar diversos procedimientos estadísticos conocidos en la técnica para determinar qué moléculas diana están presentes en la muestra que se está analizando.

Para realizaciones concretas, la síntesis de realizaciones concretas de reactivos de detección de dianas, y de los componentes de los mismos (*por ejemplo*, restos de unión a diana y moldes de compómeros), se lleva a cabo utilizando procedimientos sintéticos en estado sólido, que permiten producir una amplia variedad de compuestos utilizando procedimientos combinatorios. En dichas realizaciones, los restos de unión a diana y los moldes de compómero se pueden sintetizar repitiendo la etapa de añadir una subunidad activada (*por ejemplo*, una especie de monómero de nucleósido activada o una especie de aminoácido activada) en condiciones que permitan la polimerización de un ácido nucleico o polipéptido en crecimiento tantas veces como sea necesario para sintetizar la especie molecular deseada. Tras completar la síntesis de los restos de unión a diana y de los moldes de compómeros, se pueden unir juntos. Dichos enlaces pueden ser directos, en que un extremo del molde del compómero lineal se une directamente al resto de unión a la diana deseado utilizando la química adecuada. De forma alternativa, el enlace puede ser indirecto, de tal manera que la molécula enlazadora se usa para enlazar de forma covalente un molde de compómero al resto de unión a la diana deseado, tanto de forma simultánea como secuencial. El enlace de un enlazador a un molde de compómero puede ser igual o diferente que el usado para enlazar el enlazador al resto de unión a la diana. Se puede emplear cualquier enlazador deseado. Las moléculas enlazadoras preferidas incluyen cadenas alifáticas que comprenden de 1 a aproximadamente 100 o más átomos de carbono. Aunque los restos de unión a compómero y los moldes de compómero se unen preferiblemente de forma covalente, los enlaces pueden ser no covalentes, en cuyo caso se forman preferiblemente por los miembros de una pareja de unión de alta afinidad. En las realizaciones en las que un reactivo de detección de dianas comprende un resto de unión a la diana y un molde de compómero ensamblados a partir de las subunidades que se pueden polimerizar utilizando químicas compatibles (*por ejemplo*, nucleobases polimerizadas utilizando la misma química de la estructura), se prefiere a menudo sintetizar el reactivo de detección de dianas completo en una única serie de reacciones.

C. Procedimientos de detección de dianas

La invención de acuerdo con las reivindicaciones proporciona además procedimientos para detectar moléculas específicas de la diana. Dichos procedimientos incluyen las etapas de; (a) obtener un reactivo de detección de dianas específico de dianas que comprende un resto de unión a la diana y un molde de compómero; (b) poner en contacto una muestra conocida o sospechosa de contener la molécula diana con el reactivo de detección de dianas para producir complejos de reactivo:diana; (c) generar a (o el sustrato de escisión), a partir del molde de compómero, y (d) usar una técnica de detección de masas adecuada para detectar la especie de compómero generada en el ensayo y detectar por tanto de forma indirecta la molécula diana correlacionada con la especie de compómero concreta. Se pueden llevar a cabo dichos procedimientos para una única especie de molécula diana, pequeños grupos de especies de moléculas diana diferentes, y grandes cantidades de especies de moléculas diana diferentes en formatos multiplexados, *por ejemplo*, para detectar uno o más de varios compómeros correlacionados cada uno con la misma molécula diana, para detectar una o más especies de compómeros cada una de las cuales está correlacionada con dos o más especies de moléculas diana diferentes, y para detectar de forma indirecta una pluralidad de diferentes especies de moléculas diana utilizando una biblioteca de especies de compómeros, cada una de las cuales está correlacionada con solo una molécula diana. Como se apreciará se pueden utilizar diferentes compómeros para detectar de forma simultánea, decenas, cientos, e incluso miles de diferentes especies de moléculas diana (*por ejemplo*, ácidos nucleicos diana) en un único ensayo.

Se pueden diseñar bibliotecas de especies de compómeros para el uso en una variedad de ensayos diferentes, o para indicar de forma indirecta la presencia de diferentes moléculas diana. *Por ejemplo*, en algunas realizaciones, los compómeros de la invención se usan en el análisis de las muestras del paciente para detectar la presencia de una o más variaciones genéticas entre especies. En otras realizaciones, la misma biblioteca de compómeros, codificada por los mismos moldes de compómeros, se une a diferentes restos de unión a diana, *por ejemplo*, restos de unión a diana que se unen de forma específica a los ácidos nucleico o los polipéptidos de otras especies, *por ejemplo*, patógenos conocidos por infectar especies hospedadoras concretas. De forma alternativa, los moldes de compómeros se pueden unir a restos de unión a diana que se dirigen a biomoléculas diferentes de los ácidos nucleicos, *por ejemplo*, hidratos de carbono, lípidos, proteínas o polipéptidos.

Se pueden genomanipular las bibliotecas de compómero para que tengan cualquier tamaño adecuado, y comprenderán al menos dos diferentes especies de compómeros (ya que, por supuesto, los moldes de compómeros codificarán los compómeros o los sustratos de escisión). El límite superior del tamaño de la biblioteca limitará factores tales como la resolución del sistema de detección empleado, la biodisponibilidad de las subunidades

isotópicamente definidas (en determinadas especies en las que se usa la discriminación de masas para distinguir las especies de compómeros), y las diferencias en los incrementos entre las especies que comprenden la biblioteca. De forma clara, para un multiplexado a gran escala, se prefiere que los reactivos de detección de dianas proporcionen la generación de muchas especies de compómeros diferentes.

De esta manera, la presente invención se refiere a los procedimientos para detectar una molécula diana, a menudo muchas especies de moléculas diana diferentes, en una única reacción. En general, dichos procedimientos multiplexados implican obtener una pluralidad de reactivos de detección de dianas de acuerdo con la invención. En la mayoría de realizaciones, cada especie de reactivo de detección de dianas incluye un resto de unión a la diana y un molde de compómero que codifica un molde que permite la generación directa o indirecta de un compómero correlacionado con la molécula diana concreta dirigido por el resto de unión a la diana. Se produce la generación directa de un compómero o sustrato de escisión utilizando la parte que codifica el compómero (o que codifica el sustrato de escisión) del molde de compómero como una guía para la generación química o enzimática del compómero codificado (o del sustrato de escisión). En algunas realizaciones preferidas, la generación del compómero o del sustrato de escisión da como resultado la transcripción de una unidad de transcripción transportada en el molde de compómero por una ARN polimerasa adecuada para generar un compómero (o sustrato de escisión que contiene un compómero). En otras realizaciones, un cebador corto llega a hibridarse con una región complementaria de bases en el molde de compómero, después de los cual se extiende, por ejemplo, en una reacción de extensión del cebador en el que la extensión está catalizada por una polimerasa adecuada. Por otra parte, la generación indirecta del compómero, se refiere a la inclusión de una o más etapas intermedias entre, por ejemplo, la etapa de transcripción y la generación del compómero (o del sustrato de escisión). Como un ejemplo, en las realizaciones en las que un compómero está codificado dentro de una unidad de transcripción de un molde de compómero, los transcritos de ARNm generados a partir de la unidad de transcripción se pueden traducir en polipéptidos específicos, que pueden requerir o no procesamiento adicional (por ejemplo, la escisión, que puede desearse en casos en los que el polipéptido inicial es un sustrato de escisión que debe procesarse adicionalmente para liberar el compómero contenido en el anterior.

Como los expertos en la técnica apreciarán, cuando las moléculas diana son moléculas de ácido nucleico, puede ser deseable amplificar las porciones de los ácidos nucleicos a fin de aumentar la representación de las moléculas diana en la muestra antes de la generación del compómero. Se puede emplear cualquier procedimiento de amplificación que utilice cebadores que permita buscar de forma específica la amplificación de las moléculas diana. Antes, aunque en algunas realizaciones tras la amplificación deben detectarse los reactivos de detección de dianas específicos de las moléculas diana concreta incluidos en la reacción. En otras realizaciones, la amplificación de la regiones diana está mediada por los propios componentes de los reactivos de detección de dianas, normalmente, mediante la inclusión de uno o más sitios de unión a cebador en el reactivo de detección de dianas. Preferiblemente, los sitios de unión a cebador flanquean, o están en el exterior de la parte del molde de compómero del reactivo de detección de dianas. Preferiblemente, los sitios de unión al cebador se genomanipulan para ser tanto 5' o 3' al molde del compómero del reactivo de detección de dianas concreto. En realizaciones particularmente preferidas, se incluyen al menos dos sitios de unión a cebador diferentes (siendo uno realmente complementario al primer cebador, siendo el otro el complemento de un segundo cebador que se puede hibridar a la hebra extendida desde el primer cebador) en un reactivo de detección de dianas.

Por ejemplo, tal como se ilustra en la Figura 8, en determinadas realizaciones preferidas un reactivo de detección de dianas comprende dos o más porciones que deben unirse a fin de generar posteriormente los compómeros. Tal como se muestra en la Figura 8, se pueden generar dos reactivos de detección de dianas diferentes a partir de tres oligonucleótidos diferentes. Dos de los oligonucleótidos (cada uno un "primer" oligonucleótido) son específicos de alelo, y permiten una diferencia de un único nucleótido (A o G) en una posición del nucleótido, que se va a distinguir debido a una diferencia en la nucleobase del extremo 3' de cada primer oligonucleótido (una "T" en uno y una "C" en el otro). El otro oligonucleótido (el "segundo" oligonucleótido) no es específico de alelo, y se diseña para contener una parte del resto de unión a la dianas que es sustancialmente complementaria, y preferiblemente perfectamente complementaria con una parte de la secuencia diana. Tras la hibridación del primer y el segundo oligonucleótidos, la yuxtaposición de uno de los dos primeros oligonucleótidos (*es decir*, teniendo uno una nucleobase en el extremo 3' complementaria con el nucleótido presente en la molécula diana concreta) con el segundo oligonucleótido, lo que permite que el primer y el segundo oligonucleótidos se unan (preferiblemente mediante una reacción de ligadura) para formar un reactivo de detección de dianas completo. Dado que, tal como se muestra en la realización en la Figura 8, el primer y el segundo oligonucleótidos están flanqueados por sitios de unión a cebador universales, las especies de reactivos de detección de dianas concretas (y otras que pueden estar presentes en la reacción que incluyen los mismos sitios de unión del cebador) se pueden amplificar posteriormente para dar como resultado sustratos que se pueden usar para la generación del sustrato de escisión (o el compómero) por la transcripción procedente del promotor mediada por la ARN polimerasa.

Como se apreciará, en las realizaciones de los reactivos de detección de dianas que incluyen dos sitios de unión al cebador (lo que significa un sitio de unión al cebador para el primer cebador y el complemento de un sitio de unión al cebador para un segundo cebador), uno, y preferiblemente ambos sitios se genomanipulan para unirse a un cebador universal, particularmente cuando se pretende para el uso en ensayos multiplexados. En algunas realizaciones, en las que se usa una pareja de cebadores para amplificar parte o todo de un reactivo de detección de dianas tras la

interacción, por tanto, del reactivo con la biomolécula dirigida, puede ser deseable emplear sitios de unión a cebador en los que un sitio se une a un cebador universal mientras que el otro sitio es específico de la especie de reactivo de detección de dianas concreta. Aunque se prefiere menos, debe entenderse también que la invención abarca las realizaciones que las que los sitios de unión a cebador no están dirigidos por cebadores universales, sino que en vez de esto están dirigidos por cebadores específicos de la especie de reactivo de detección de dianas concreta. Además, los reactivos de detección de dianas concretos se pueden genomanipular para incluir más de dos sitios de unión a cebador, facilitando por tanto la amplificación de diferentes porciones del reactivo utilizando diferentes cebadores.

De esta manera, en las realizaciones preferidas, después de la amplificación, si se lleva a cabo, se pueden generar compómeros (o precursores más grandes que comprenden compómeros) a partir de los moldes de compómeros incluidos en una o más especies de reactivos de detección de dianas incluidos en la reacción. Se dan a conocer los procedimientos para generar un compómero, y comprenden combinar subunidades, *por ejemplo*, subunidades que contienen nucleobases (*por ejemplo*, nucleótidos), aminoácidos, restos de azúcares, *etc.*, de la misma o diferente especie de subunidad en condiciones que permitan la polimerización. Normalmente, los nucleótidos se polimerizan por una polimerasa, mientras que los oligonucleótidos se polimerizan por una ligasa. Los procedimientos particularmente preferidos son aquellos en el que los compómeros o los sustratos de escisión se generan a partir de unidades de transcripción en un molde de compómero correspondiente utilizando una enzima. Las enzimas especialmente preferidas para polimerizar ribonucleótidos son las ARN polimerasa, particularmente las ARN polimerasas T7, T3, y SP6, aunque se pueden usar otras ARN polimerasas, con la condición que el molde de compómero codifique un promotor adecuado. En la divulgación, cuando los compómeros o los sustratos de escisión se preparan de restos de aminoácidos, los procedimientos de síntesis preferidos son también enzimáticos. Se prefieren los procedimientos de traducción *in vitro*, en los que los ARNm transcritos o generados de otra manera a partir de las unidades de transcripción correspondientes se traducen en polipéptidos. Se pueden emplear también procedimientos de extensión del cebador para generar compómeros y sustratos de escisión. Se contempla que se puedan emplear otros procedimientos de polimerización de las subunidades, sean las subunidades monoméricas o pluralidades de subunidades monoméricas ensambladas en precursores para un posterior ensamblaje en unidades más grandes, hasta e incluyendo compómeros, sustratos de escisión, unidades de transcripción, moldes de compómeros, oligonucleótidos, *etc.* De esta manera, en otras realizaciones, la polimerización del compómero está mediada por síntesis química. En el contexto de los compómeros basados en ácidos nucleicos, los procedimientos sintéticos preferidos son esencialmente aquellos para la síntesis normalizada de ácidos nucleicos y péptidos sintéticos, respectivamente. En realizaciones adicionales, las subunidades de nucleobases, tales como los nucleótidos incluidos en un compómero, pueden tener una modificación en la terminación de la cadena. Por ejemplo, un nucleótido añadido puede ser un didesoxinucleótido finalizador de la cadena, que evita por tanto la adición de otros nucleótidos. En otras realizaciones, una subunidad añadida a un compómero puede contener un resto que bloquea una nucleasa para evitar la digestión del compómero o del sustrato de escisión por la nucleasa, tal como por una ribonucleasa.

Tal como se ha descrito anteriormente, cada especie de compómero tiene una característica definida que permite distinguirla de otra especie de compómero que se puede generar en un ensayo dado. Tomando la masa como la característica definida, cada especie de compómero se genomanipulará de tal manera que cuando se genere en un ensayo tendrá una masa única o intervalo de masas que permita que se resuelva a partir de la otra especie de compómero potencial mediante el sistema de detección de masas utilizado en el análisis concreto. Como resultado, la detección de un compómero correlacionado con una molécula diana concreta indica de forma indirecta que la molécula diana dirigida por el resto de unión a la diana del reactivo de detección de dianas está presente en la muestra que se está ensayando.

En los procedimientos de la invención, una muestra conocida o sospechosa de contener la(s) molécula(s) diana de interés se pone en contacto con una o más especies de reactivos de detección de dianas en las condiciones adecuadas para permitir la formación de complejos de reactivo:diana. Si se desea, y se ha diseñado el reactivo de detección de dianas para ser, o ser capaz de otra manera de, amplificarse, los reactivos de detección de dianas que forman los complejos de reactivo:diana pueden amplificarse utilizando un procedimiento compatible con el diseño del reactivo de detección de dianas concreto. A continuación se pueden generar los sustratos de escisión, después de lo cual se puede someter una alícuota de la reacción a una técnica de detección capaz de distinguir especies de compómeros basándose en la característica definida genomanipulada para este fin. La característica definida es la masa, y los procedimientos preferidos para distinguir las especies de compómeros, si acaso, basándose en la masa son la espectrometría de masas, particularmente la espectrometría de masas MALDI-TOF. La detección de una especie de compómero indica que la molécula diana correlacionada con el compómero ha estado presente en la muestra.

Como se describe en el presente documento, más de una molécula diana, que incluye una especie de una molécula de ácido nucleico diana, puede detectarse de forma simultánea en una muestra concreta. Por tanto, se pueden detectar de forma indirecta diferentes tipos de moléculas diana, por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, lípidos, hidratos de carbono, *etc.*, en el mismo ensayo mediante la aplicación de los presentes procedimientos. Se puede conseguir dicho "multiplexado" utilizando diferentes especies de compómeros, en las que cada especie de compómeros está preferiblemente correlacionada de forma única con una molécula diana concreta, de tal manera

que la detección de la especie de compómero correlacionada con la anterior señala de forma indirecta que la molécula diana ha estado presente en la muestra que se está analizando. Las diferentes especies de compómeros se pueden distinguir en un único ensayo en virtud de las diferencias en la(s) característica(s) definida(s) de cada especie de compómero. Tomando las diferencias de masa, se puede usar el análisis de sensibilidad de la masa basado en diferencias en el peso molecular para distinguir entre diversas especies de compómeros. Como se apreciará, las diferencias de masas entre los compómeros deben ser preferiblemente suficientemente grandes para resolverse empleándose la plataforma concreta del análisis de masas (es decir, el hardware y el software). En el contexto de los compómeros, se puede conseguir la diferencia de masas tanto mediante la secuencia (composición o longitud) de la especie de compómero como introduciendo los restos que modifican la masa en uno o más de los bloques de construcción (*por ejemplo*, ribonucleótidos en el caso de los compómeros basados en ARN) utilizados en la síntesis de los compómeros. Los ejemplos de restos que modifican la masa incluyen, por ejemplo, un halógeno (*por ejemplo*, F, Cl, Br y/o I), un azido, o del tipo XR, en el que X es un grupo de unión y R es una funcionalidad que modifica la masa. Útil también en el diseño de compómeros de masas específicas son los nucleótidos que están isotópicamente definidos, en que una o más de las especies de átomos pesados (es decir, N, C, O, *etc.*) presentes en una especie de nucleótido concreta se enriquecerán para un isótopo concreto.

Sin limitar el ámbito de la invención, en las realizaciones en las que la masa es la característica definida, se pueden introducir modificaciones de la masa de diferentes incrementos durante la generación del compómero o del sustrato de escisión, preferiblemente a través de la incorporación de bloques de construcción modificados por la masa (*por ejemplo*, ribonucleótidos) en compómeros o sustratos de escisión nascentes, particularmente cuando una o más especies se van a generar de forma simultánea de tal manera que sus respectivas masas deben ser difíciles de resolver. Los incrementos de masa pueden ser uniformes, tal como se produce cuando una especie de resto que modifica una única masa se usa para modificar las masas de uno o más de los diferentes bloques de construcción usados para la síntesis de los compómeros en un ensayo dado. De forma alternativa, los incrementos de masa pueden ser no uniformes, como se puede producir cuando se usan restos que modifican diferentes masas. Se puede usar cualquier química adecuada para unir un resto modificador de masa a un bloque de construcción de un compómero. Por ejemplo, si los derivados de oligo/polietilenglicol tienen un incremento modificador de la masa de 44, se pueden generar cinco especies modificadoras de masa diferentes cambiando exactamente el uso de 0 a 4 de estos restos. Un oligo/polietilenglicol puede estar monoalquilado por un alquilo inferior tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, t-butilo, y similar. Se pueden usar también funcionalidades de unión para unir los restos modificadores de masa con uno o más de los bloques de construcción de compómeros. Por supuesto, se pueden seleccionar también restos modificadores de masa diferentes de los oligo/polietilenglicoles y unirse mediante químicas de enlace adecuadas.

Puesto que es probable que una o más moléculas diana concretas estén presentes en una muestra dada solo en cantidades traza, se prefiere a menudo amplificar tanto la(s) molécula(s) diana como, incluso, de forma más preferible, los reactivos de detección de dianas (o una parte de los mismos, *es decir*, el molde de compómero) antes de la síntesis del compómero. Esto asegura que una cantidad suficiente de moléculas de compómeros se sintetizará para la posterior detección en el caso en el que la correspondiente molécula de compómero esté presente en la muestra.

En las realizaciones en las que las especies de moléculas diana son ácidos nucleicos y se desea amplificar las dianas antes de la exposición a los reactivos de detección de dianas, se puede emplear cualquier técnica de amplificación de ácidos nucleicos adecuada. Un procedimiento preferido es la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR" y sus variantes, mientras que otro procedimiento preferido es un procedimiento de amplificación isotérmico basado en la transcripción. Con respecto al procedimiento de amplificación empleado, la amplificación de cada diana (a no ser que dos o más dianas comprendan variantes genéticas en la misma región del mismo gen) requiere normalmente el uso de al menos dos cebadores de amplificación distintos. De esta manera, las reacciones muy multiplexadas requieren el uso de numerosas parejas de cebadores de amplificación diferentes, lo que en muchos casos conduce a diferencias en la eficacia de la amplificación de una o más de las dianas. Por este motivo, se prefiere que las reacciones de amplificación se lleven a cabo después de que la muestra se ha puesto en contacto con los diversos reactivos de detección usados en el ensayo concreto. A continuación se lleva a cabo la amplificación utilizando los complejos de reactivo:diana que pueden, pero no necesitan, aislarse de los otros componentes de la reacción inicial antes de la amplificación. Debido a esto, aquellas porciones que los reactivos de detección de dianas diseñadas para amplificarse (*es decir*, al menos los moldes de los compómeros), se pueden amplificar utilizando tan poco como una única pareja de cebadores de la amplificación. En dichos casos, los cebadores se denominan "cebadores universales" ya que se puede usar para amplificar todos los ácidos nucleicos deseados que se van a amplificar en una amplificación multiplexada concreta. Además, la reacción de amplificación se puede optimizar para la pareja de cebadores universales concreta diseñada para el uso en un ensayo particular a fin de conseguir una amplificación eficaz de alto nivel. Tal como saben los expertos en la técnica, la región del ácido nucleico que se va a amplificar está flanqueada por los sitios de unión (o sus componentes) de los cebadores de la amplificación.

Tal como se ha descrito anteriormente, en las reacciones multiplexadas es más deseable usar solo una única pareja de cebadores "universales" para cebar las reacciones de extensión en el procedimiento de amplificación. De esta manera, se puede usar una pareja de cebadores para amplificar cada una de las diferentes secuencias de ácidos

nucleicos entre paréntesis por los sitios de unión al cebador. Por supuesto, es también posible usar más de una pareja de cebadores, incluso como mucho como una o más parejas de cebadores por especie de ácido nucleico diferente que se va a amplificar. En otras realizaciones, se puede usar una única especie de cebador para cebar la síntesis de la hebra directa o inversa de un amplicón concreto, en cuyo caso, un sitio de unión (o el complemento del mismo) se sitúa para flanquear un extremo de cada una de las diferentes especies de ácidos nucleicos que se van a amplificar. El otro cebador de la pareja de cebadores será específico del ácido nucleico concreto que se está amplificando. Por tanto, en dichas realizaciones, cada pareja de cebador comprenderá un cebador universal y un cebador específico del ácido nucleico concreto. Si se desea, un cebador de amplificación puede contener también un grupo funcional capaz de inmovilizarse sobre un soporte sólido, tal como biotina o digoxigenina. A continuación, si se desea, los amplicones resultantes pueden aislarse de los otros componentes de la reacción

Como se describe en el presente documento, los procedimientos de la invención se usan preferiblemente en formatos multiplexados. En los ejemplos preferidos de dichos formatos, cada molécula diana que se va a detectar está correlacionada con una especie de compómero diferente, es decir, cada compómero identifica únicamente una molécula diana concreta en el ensayo particular. Por tanto, en comparación entre sí, cada especie de reactivo de detección diana comprende un resto de unión a la diana diferente y un molde de compómero diferente. De esta manera, la posterior detección del compómero concreto indica de forma indirecta la presencia en la muestra de la molécula diana con la cual el compómero se ha correlacionado.

Por supuesto, además de dichas realizaciones de una diana/un compómero, se abarcan también otras. Por ejemplo, la invención abarca también las realizaciones en las que una muestra que contiene una o más especies de moléculas diana se pone en contacto con una pluralidad de reactivos de detección de dianas, dos o más de los cuales comprenden un molde de compómero que codifica la misma especie de compómero para la especie de molécula diana. De esta manera, la posterior detección de una especie de compómero concreta indica que una o más de las diversas dianas con el compómero ha estado presente en la muestra que se está ensayando. Dichos resultados se pueden deconvolucionar mediante experimentación o análisis estadístico para determinar qué moléculas dianas han estado presentes en la muestra. En otras realizaciones, el procedimiento implica ensayar una muestra utilizando una pluralidad de diferentes reactivos de detección de dianas de una diana concreta que difiere no en sus restos de unión a diana, sino en sus moldes de compómeros. De acuerdo con lo anterior, los reactivos de detección de dianas se dirigen a la misma molécula diana, y la posterior detección de cualquiera, alguno o todos los compómeros correlacionados con la diana concreta indican que la diana no ha estado presente en la muestra.

D. Detección de compómeros

Se pueden detectar compómeros utilizando cualquier procedimiento de detección adecuado para detectar la una o más especies de compómeros que se pueden generar en un ensayo dado, aunque puede variar el nivel de posible multiplexado en un ensayo dado. Los ejemplos representativos de los sistemas de detección que se pueden emplear para este fin incluyen la espectrometría de masas, la electroforesis, la cromatografía, la hibridación del ácido nucleico, y la RMN. La característica definida útil para distinguir especies de compómeros se refiere a la masa. Una detección particularmente preferida es la espectrometría de masas, sin embargo, como apreciarán los expertos en la técnica, se pueden adaptar fácilmente otros sistemas de detección conocidos en la materia para el uso en la práctica de la invención basándose en esta memoria. Los formatos de espectrómetros de masas preferidos para el uso en la invención son la electropulverización (EP), ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), resonancia de ion ciclotrón (ICR), y Transformada de Fourier. Para la EP, la muestra, disuelta en agua o en un tampón volátil, se inyecta tanto de forma continua como de forma discontinua en una interface de ionización de la presión atmosférica (API) y a continuación se analiza la masa mediante un cuadrupolo. La generación de múltiples picos de iones que se pueden obtener utilizando la espectrometría de masas por EP puede aumentar la precisión de la determinación de la masa. Se puede obtener incluso información más detallada sobre la estructura específica utilizando una configuración MS/MS cuadrupolo. En la espectrometría de masas MALDI, se pueden utilizar diversos analizadores de masas, por ejemplo instrumentos de sector magnético/deflexión magnética en un modo de cuadrupolo simple o triple (MS/MS), configuraciones de Transformada de Fourier y tiempo de vuelo (TOF). Para el procedimiento de desorción/ionización, se puede utilizar cualquier combinación matriz/láser adecuada, se pueden emplear configuraciones de trampa de iones y reflectrón. Actualmente, se prefiere más la espectrometría de masas MALDI-TOF. La espectrometría de masas y otros procedimientos de detección de compómeros se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos números 5.118.937; 5.202.561; 5.464.985; 5.547.835; 5.605.798; 5.622.824; 5.691.141; 5.777.324; 5.864.137; 5.869.242; 5.919.646; 5.922.542; 5.928.906; 6.024.925; 6.043.031; 6.051.378; 6.090.558; 6.104.028; 6.111.251; 6.194.144; 6.197.498; 6.207.370; 6.221.601; 6.221.605; 6.225.450; 6.235.478; 6.238.871; 6.258.538; 6.268.131; 6.268.144; 6.277.573; 6.300.076; 6.322.970; 6.379.917; 6.387.628; 6.423.966; 6.428.955; 6.436.635; 6.440.705; 6.458.945; 6.468.748; 6.475.736; 6.500.621; 6.500.650; 6.558.902; 6.566.055; 6.566.059; 6.582.923; 6.589.485; 6.602.662; 6.610.492; 6.635.452; 6.660.229; 6.706.530; y 6.723.564, así como en las solicitudes de patentes de los Estados Unidos del solicitante, con números de serie 09/839.629 (número de publicación 20020155587) y 10/128.680 (número de publicación 20030033091).

Antes del análisis de masas (por ejemplo, mediante espectrometría de masas), puede ser útil "acondicionar" las moléculas de ácido nucleico para reducir la energía láser requerida para la volatilización y/o minimizar la fragmentación. El acondicionamiento se lleva a cabo preferiblemente mientras que el sitio de detección de la diana está inmovilizado. Un ejemplo de acondicionamiento es la modificación de la estructura de fosfodiéster de la

molécula de ácido nucleico (*por ejemplo*, intercambio de cationes) que puede ser útil para eliminar la ampliación del pico debida a la heterogeneidad en los cationes unidos por unidad de nucleótido. Poner en contacto una molécula de ácido nucleico con un agente alquilante tal como yoduro de alquilo, yodoacetamida, β -yodoetanol, o 2,3-epoxi-1-propanol puede transformar los enlaces monotiofosfodiéster en derivados no cargados que emplean cloruros de trialquilsililo. El acondicionamiento adicional implica incorporar nucleótidos con sensibilidad reducida para la despurinación, tales como nucleótidos de N7 o N9-desazapurina, o bloques de construcción de ARN o utilizar triésteres de oligonucleótidos o incorporar funciones de fosforotioato que están alquiladas o que emplean miméticos de oligonucleótidos tales como ácidos nucleicos peptídicos (ANP).

E. Aplicaciones

Los reactivos de detección de dianas y los compómeros que los codifican tienen una variedad de usos. Por ejemplo, los restos de unión a diana pueden dirigirse a biomoléculas conocidas concretas, que incluyen proteínas y ácidos nucleicos. Las moléculas diana especialmente preferidas son aquellas que se conocen por estar asociadas con, si no la causa de, una dolencia concreta tal como una enfermedad o trastorno. Después que un reactivo de detección de dianas específico de una molécula diana se une a la molécula diana, se puede generar un compómero a partir del molde de compómero, después de lo cual este puede a continuación detectarse utilizando un sistema de detección compatible, indicando por tanto de forma indirecta la presencia de una molécula diana concreta.

En algunas realizaciones, se pueden usar los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo, para detectar cualquier variación genética conocida, incluyendo cualquiera de las más de 4.000 enfermedades genéticas heredables humanas conocidas actualmente (por ejemplo, hemofilias, talasemias, Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Enfermedad de Huntington (EH), Enfermedad de Alzheimer, y Fibrosis Quística (FQ)). Determinadas variaciones genéticas, por ejemplo, algunos SNP, se sabe que están asociados con enfermedades concretas. Además de detectar los SNP y mutaciones puntuales, alguno de los cuales están correlacionados con, por ejemplo, la incidencia de o la predisposición a una enfermedad específica, sin respuesta o una reacción adversa a un fármaco concreto, etc., se pueden detectar también otras variaciones genéticas utilizando los presentes procedimientos, que incluyen aquellos que producen determinados defectos congénitos que son el resultado de anomalías cromosómicas, tales como Trisomía 21, Trisomía 13, Trisomía 18, Monosomía X, y otras aneuploidías de los cromosomas sexuales tales como el Síndrome de Klinefelter. Otras variaciones genéticas adicionales que se pueden detectar de acuerdo con la invención incluyen eliminaciones, duplicaciones, inserciones, y reordenaciones. De forma adicional, modificaciones (por ejemplo, modificaciones químicas tales como metilación) en genes y regiones no codificantes de cromosomas y elementos extracromosómicos. Se pueden estudiar también diferencias en el procesamiento del ARN y en la transcripción génica utilizando los presentes procedimientos.

Virus, bacterias, hongos, y otros patógenos contienen secuencias de ácidos nucleicos que se pueden distinguir de las del organismo hospedador. Detectar o cuantificar las secuencias de ácidos nucleicos u otras biomoléculas (*por ejemplo*, proteínas, enzimas, componentes de la pared celular, etc.) que son específicas de un organismo infeccioso puede ser importante para diagnosticar o vigilar el tratamiento de una infección. Los ejemplos de virus productores de enfermedades que infectan seres humanos y animales incluyen retrovirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 y VIH-2, y virus de la leucemia de felino); picornavirus (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus Cocksackie humanos, rinovirus, y ecovirus; calcivirus (por ejemplo, cepas productoras de gastroenteritis, togavirus (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola); flavivirus (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); coronavirus; rabdovirus (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); filovirus (por ejemplo, virus ébola); paramixovirus (por ejemplo, virus paragripal, virus de las paperas, virus de la varicela, virus sincitial respiratorio); ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe); bungavirus (por ejemplo, virus de Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); arenavirus (por ejemplo, virus de la fiebre hemorrágica); reovirus (por ejemplo, reovirus, orbivirus, y rotavirus); birnavirus; hepadnavirus (por ejemplo, virus de la Hepatitis B); parvovirus; papovavirus (por ejemplo, virus del papiloma, poliomavirus); adenovirus; virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), herpesvirus); poxvirus (por ejemplo, virus de la viruela, virus vaccinia, poxvirus); iridovirus (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); el agente de la hepatitis delta; virus de la Hepatitis C; virus de Norwalk y relacionados; y astrovirus.

Los ejemplos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, diversas especies de *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus del Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, especies de *Campylobacter* patógenos, especies de *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, especies de *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, especies de *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponemapallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, y *Actinomyces israeli*.

Los ejemplos de hongos infecciosos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Otros organismos infecciosos (por

ejemplo, protistas) incluyen *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

Los reactivos de detección de dianas de la invención comprenden un resto de unión a la diana que es específico de la biomolécula diana que se va a detectar. Como se apreciará, el resto de unión a la diana dependerá de la molécula diana que se va a detectar. Por ejemplo, cuando la molécula diana es una molécula de ácido nucleico, se prefiere que el resto de unión a la diana del reactivo de detección de dianas sea también un polinucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido sintético u otra molécula comprendida por subunidades capaz de hibridación específica de bases en las bases de los nucleótidos que comprenden la región dirigida del ácido nucleico diana. De forma alternativa, en las realizaciones en las que la molécula diana es una proteína, un tipo molecular preferido a partir del cual se pueden obtener restos de unión a diana son los anticuerpos (las porciones de unión a antígeno de los mismos).

Como se ha descrito anteriormente, determinadas realizaciones preferidas de la invención se refieren a la detección de moléculas de ácidos nucleicos específicas de la diana. Existe una variedad de motivos para detectar un ácido nucleico concreto, que incluyen la detección de agentes infecciosos dentro de una muestra clínica, la detección de un producto de amplificación derivado de ADN o ARN genómico o ARN mensajero, la detección de la inserción de un gen (ADNc) en el interior de un clon, la detección de la metilación u otras modificaciones en las moléculas de ácidos nucleicos, la detección de ARNm diferencial de corte y empalme y/o la edición, etc. Como se apreciará, la detección del ácido nucleico diana puede emplear una o alguna combinación de los procedimientos descritos en el presente documento para la preparación del reactivo de detección de dianas y la liberación y detección del compómero codificado. Si se desea, se puede cuantificar la cantidad de compómero detectada, como puede ser el caso de un polipéptido diana que utiliza un reactivo de detección de dianas que comprende un molde de compómero y un resto de unión a la diana que comprende un anticuerpo que es específicamente reactivo con el polipéptido diana en las condiciones de reacción. En el contexto de la detección del ácido nucleico, la mayor parte de estos procedimientos implica el uso de una sonda específica de la diana (es decir, el resto de detección de dianas) como un prerrequisito para la síntesis del compómero (que está codificado por el molde de compómero del reactivo de detección de dianas que incluye también el resto de detección de dianas concreto). En los casos en los que solo pueden estar presentes pequeñas cantidades de material diana en una muestra, o si solo está disponible una pequeña cantidad de muestra, se puede emplear una técnica de amplificación para aumentar el número de moldes de compómeros.

Como se ha descrito anteriormente, una ventaja para usar los procedimientos de detección de dianas que emplean compómeros es la capacidad de ensayar de forma simultánea la presencia de muchas especies de moléculas diana. Debido a los amplios espectros de solapamiento producidos por los cromóforos fluorescentes existentes, un límite superior para el multiplexado de la fluorescencia es más probable que tenga aproximadamente diez marcas diferentes. Con un espectrómetro de masas MALDI-TOF o un espectrómetro de masas por desorción láser directa o un espectrómetro de masas por electropulverización, es posible el multiplexado de decenas, cientos, e incluso miles de diferentes compómeros.

Las realizaciones particularmente preferidas implican la detección de variantes genéticas tales como un único polimorfismo base, o los SNP que requieren generalmente un gran grado de sensibilidad. Dichos procedimientos incluyen la detección de mutaciones puntuales de tipo "hot spot" y la identificación de las bases en los sitios SNP conocidos: Se pueden preparar sondas específicas de dianas que se hibridan a dichos sitios. Para asegurar una elevada fidelidad, los restos de unión a diana específicos de SNP preferidos son aquellos que comprenden dos oligonucleótidos que se hibridan a las regiones adyacentes de una molécula diana concreta. Por ejemplo, una de las sondas se une a una parte de la diana de tal manera que la subunidad que contiene su nucleobase en el extremo 3' se hibrida solo con el nucleótido correspondiente al SNP concreto: El otro oligonucleótido se hibrida también a la diana, preferiblemente de tal manera que su resto del extremo 5' se puede unir al resto del extremo 3' del primer oligonucleótido. Los oligonucleótidos hibridados de esta manera con un ácido nucleico diana se dice que están yuxtapuestos. De esta manera, se pueden proporcionar uno o más de los primeros oligonucleótidos para distinguir los diversos polimorfismo(s) en una posición concreta del nucleótido en la molécula del ácido nucleico diana, mientras que el segundo oligonucleótido, aunque específico de su secuencia diana, no es específico de una variación genética concreta. Por supuesto, se pueden usar también realizaciones que emplean tres o más oligonucleótidos capaces de hibridarse en posiciones yuxtapuestas en un ácido nucleico diana. Otras realizaciones implican parejas de oligonucleótidos (o grupos más grandes) en los que aparece un hueco que se extiende a uno o más nucleótidos tras la hibridación de los oligonucleótidos que comprenden el grupo. En dichas realizaciones, se puede llevar a cabo una reacción de relleno del hueco para rellenar el(los) hueco(s) y permitir a los oligonucleótidos unirse para formar un sustrato que se puede usar para la generación de compómeros, preferiblemente después de la amplificación.

Las realizaciones de detección del SNP preferidas abarcan el multiplexado de un gran número de diferentes reactivos de detección de dianas a fin de detectar muchas variaciones genéticas (por ejemplo, SNP) de forma simultánea. Los compómeros están presentes de forma preferible para la detección de la señal de únicamente una o más de las diversas variantes que se pueden detectar utilizando la configuración o la biblioteca concreta, de los reactivos de detección de dianas.

Dependiendo de las circunstancias de un ensayo concreto, se pueden preformar los procedimientos de la invención antes o después del nacimiento, y se pueden llevar a cabo después de la muerte.

Los procedimientos de la invención tienen una variedad de aplicaciones además de la mera detección de si una o más moléculas diana concretas están presentes en una muestra, incluyendo la genotipación individual y la determinación de la identidad o la herencia (*por ejemplo*, paternidad o maternidad). Como la Figura 8 muestra, se pueden evaluar las posiciones de nucleótidos concretas, incluyendo la determinación de si un genoma diploide concreto (si la parte relevante del mismo está presente en una muestra) es homocigótico o heterocigótico para una variación alélica concreta.

Otra aplicación se refiere a las realizaciones de la invención que se refieren a la vigilancia de la expresión génica. En dichas realizaciones, se usan diferentes reactivos de detección de dianas para detectar los compómeros representativos de los genes que se han expresado en un cultivo celular concreto y que están presente en concentraciones relacionadas con los niveles de abundancia del ARNm del gen concreto. Los ácidos nucleicos diana comprenden normalmente el ARNm o el ADNc de la primera hebra, así como los productos de ácidos nucleicos amplificado. Por tanto, los ácidos nucleicos diana deben estar presentes en concentraciones relacionadas con sus niveles de abundancia del ARNm. Si se desea, se puede usar la amplificación para amplificar selectivamente un subconjunto del combinado de ARNm procedente de una muestra de células para aumentar la señal de detección de aquellos genes y reducir el fondo de los genes en el exterior del subconjunto amplificado. Como con otros procedimientos de la invención, dichos procedimientos emplean normalmente un reactivo de detección de dianas para cada gen (o una parte del mismo) de interés, tal como la posterior detección de una especie de compómero correlacionada con la molécula diana concreta indica de forma indirecta que el gen se está expresando en la muestra.

Todas las composiciones y procedimientos dados a conocer y reivindicados en el presente documento se pueden preparar y ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y procedimientos de esta invención se han descrito en términos de las realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y procedimiento y en las etapas o en la secuencia de etapas del procedimiento descrito en el presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y ámbito de la invención. De forma más específica, será evidente que determinados agentes que están química y fisiológicamente relacionados pueden sustituirse por los agentes descritos en el presente documento mientras que se puedan conseguir los mismo o similares resultados. Todos los mencionados sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se considera que están comprendidos en el espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria son indicativas de los niveles de conocimientos de las personas expertas en la técnica a la cual pertenece la invención.

La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento se puede poner en práctica de manera adecuada en ausencia de cualquier(cualesquiera) elemento(s) no específicamente dados a conocer en el presente documento. De esta manera, por ejemplo, en cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en", y "que consta de" puede estar sustituido con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no se tiene la intención de que el uso de dichos términos y expresiones excluyan cualquier equivalente de las características que se muestran y se describen o de las porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones comprendidas en el alcance de la invención reivindicada. De esta manera, debe entenderse que aunque la presente invención se ha dado a conocer de manera específica mediante las realizaciones y características opcionales preferidas, la modificación y la variación de los conceptos dados a conocer en el presente documento puede volver a reclasificarse por los expertos en la técnica, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran comprendidas en el alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar si una muestra contiene una molécula diana, comprendiendo el procedimiento:
 - a) en condiciones de reacción, poner en contacto una muestra sospechosa de contener la molécula diana con un reactivo de detección de dianas para formar un complejo reactivo:diana, en el que el reactivo de detección de dianas comprende: un resto de unión a la diana que reacciona de forma específica con la molécula diana; y un molde de compómero, o un complemento del mismo, unido al resto de unión a la diana, en el que el molde de compómero es una molécula de ácido nucleico que codifica un sustrato de escisión que comprende un compómero que está correlacionado con la molécula diana que permanece aún independiente de la secuencia o de la estructura de la molécula diana y que comprende solo una, dos, o tres subunidades de especies de ribonucleótidos con la otra parte del sustrato de escisión que contiene una o más especies de subunidades de nucleótidos al menos una de las cuales no está presente en el compómero;
 - b) usar los complejos reactivo:diana, de existir, para transcribir sustratos de escisión a partir del molde de compómero,
 - c) escindir los sustrato de escisión para liberar los compómeros; y
 - d) determinar si los compómeros se han generado detectando la masa asociada con la composición de una, dos, o tres subunidades de especies de ribonucleótidos del compómero, determinando por tanto si la muestra contiene la molécula diana.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sustrato de escisión se escinde mediante un procedimiento seleccionado a partir del grupo que consiste en un procedimiento químico, físico, y enzimático.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el molde de compómero comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una unidad de transcripción que comprende una región promotora unida a una región de codificación que codifica mínimamente un compómero.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la región promotora está seleccionada entre el grupo que consiste en una región promotora bacteriana, una región promotora de un bacteriófago, una región promotora consenso, una región promotora vírica y una región promotora eucariota.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la región promotora es una región promotora de un bacteriófago seleccionada entre el grupo que consiste en una región promotora de T7, una región promotora de SP6, y una región promotora de T3.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compómero es identificado mediante espectrometría de masas.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compómero es identificado en un intervalo de masas de 2500 a 10000 Daltons.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula diana es un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en una fuente de variación genética entre miembros de la misma especie y una molécula de ácido nucleico modificado químicamente.

Figura 1

Esquema del reactivo de detección de dianas

MC	X	RUD
-----------	----------	------------

TBM	X	CT
------------	----------	-----------

MC = molde del compómero

RUD = resto de unión a dianas

X = unión directa MC-RUD

o

un enlazador

Figura 2

Esquema del molde del compómero

región codificante del compómero	Terminador
----------------------------------	------------

Región codificante del compómero

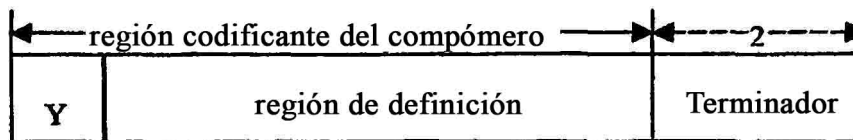
1. Contiene uno o más restos que contienen nucleobases; y
2. Sirve como molde para generar compómeros (por ejemplo, mediante procedimientos enzimáticos (por ejemplo, PCR, TMA, etc.) u otra química adecuada

Terminador

1. Permite que se defina de extremo del compómero. Los ejemplos incluyen subunidades adicionales de nucleobase, al menos una de las cuales sirve como base de escisión, una base de finalización de cadena (por ejemplo, un ddNTP), etc.

Figura 3

Esquema del molde del compómero (2)



Región codificante del compómero

- Y = 1.
2. Una o más subunidades de nucleobases –si está presente, común para todos los miembros de la biblioteca.

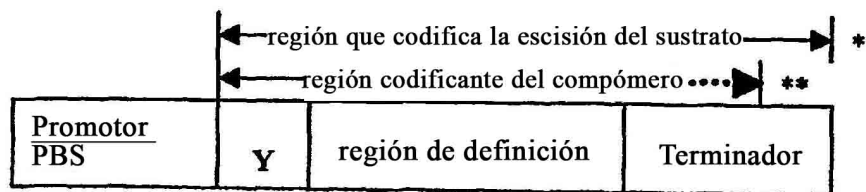
Región de definición: una o más subunidades de nucleobases sirven como molde para dicha parte de la especie de compómero que se diferencian de otros miembros de la biblioteca de compómeros particular

Terminador

1. Nada; o
2. Una o más subunidades de nucleobases incluyendo una base de escisión (nota, la escisión se puede producir en la nucleobase, la estructura, o en un enlazador entre subunidades y/o una subunidad de finalización de cadena (por ejemplo, un ddNTP), etc.; y
3. Preferiblemente común a los miembros de la biblioteca de compómero particular codificada mediante los moldes de compómero

Figura 4

Esquema del molde del compómero



Promotor – Codifica el promotor

PBS – sitio de unión del cebador – codifica el sitio de unión del cebador utilizado para la extensión del cebador

Y = nada, o una o más subunidades de nucleobase que sirven como molde de las subunidades incorporadas en el compómero codificado o en el sustrato de escisión. Nota: si se utiliza en un determinado molde de compómero, la región Y es preferiblemente común (es decir, la misma) para todas las plantillas de compómero y componentes codificados (o sustratos de escisión)

Región de definición – con en la figura 3

Terminador – como en la figura 3

*- indica que el MT (molde del compómero) codifica un sustrato de escisión que incluye al menos una unidad de nucleobase adicional en comparación con el compómero incorporado.

** - (••••) indica que el MT codifica la subunidad de nucleobase con la que finaliza la cadena.

Figura 5

Esquema del compómero

Y	región de definición	Terminador
----------	----------------------	------------

Y

- (1) Nada, o
- (2) Una o más subunidades preferiblemente comunes para todos los compómeros de la biblioteca dada

Terminador

- (1) Nada, o
- (2) Por ejemplo, una subunidad de finalización de la cadena (o parte de la misma)

Región de definición

Una o más subunidades (por ejemplo, subunidades que contienen nucleobases, subunidades de aminoácidos, etc).

Ejemplo: $[A_x C_y G_z]_k$

$x = 0-5$

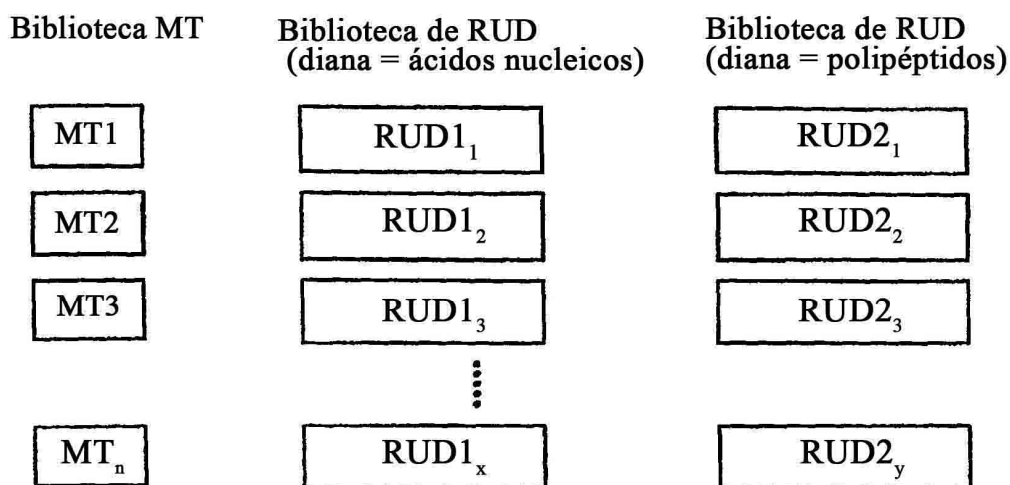
$y = 0-10$

$z = 0-10$

$k = 1-5$

Figura 6

Ensamblaje de una biblioteca de reactivos de detección de dianas a partir de una única biblioteca de moldes de compómero y dos bibliotecas de restos de unión a diana, uno dirigido a ácidos nucleicos, el otro dirigido a polipéptidos



1. Seleccionado para detectar moléculas diana a las que se dirigen RUD1₁, RUD1₂, RUD1₃, RUD1₂₀, RUD1₁₇, y RUD2₅, para un total de cinco moléculas diana.
2. Seleccionar qué MT utilizar, preferiblemente para conseguir diferencias lo suficientemente grandes entre la(s) característica(s) definidas de las 5 especies de compómero codificadas. Aquí, se han seleccionado las especies de compómero MT1-5.
3. Determinar si se debe usar un enlazador entre cada uno de MT y RUD de un reactivo de detección de diana dado.
4. Ensamblar (o sintetizar directamente) los reactivos de detección de dianas para dar los siguientes reactivos de detección de dianas:

MT1	RUD1 ₂
MT2	RUD1 ₃
MT3	RUD1 ₁₇
MT4	RUD1 ₂₀
MT5	RUD2 ₅

Figura 7

Esquemas de moldes de compómero representativos

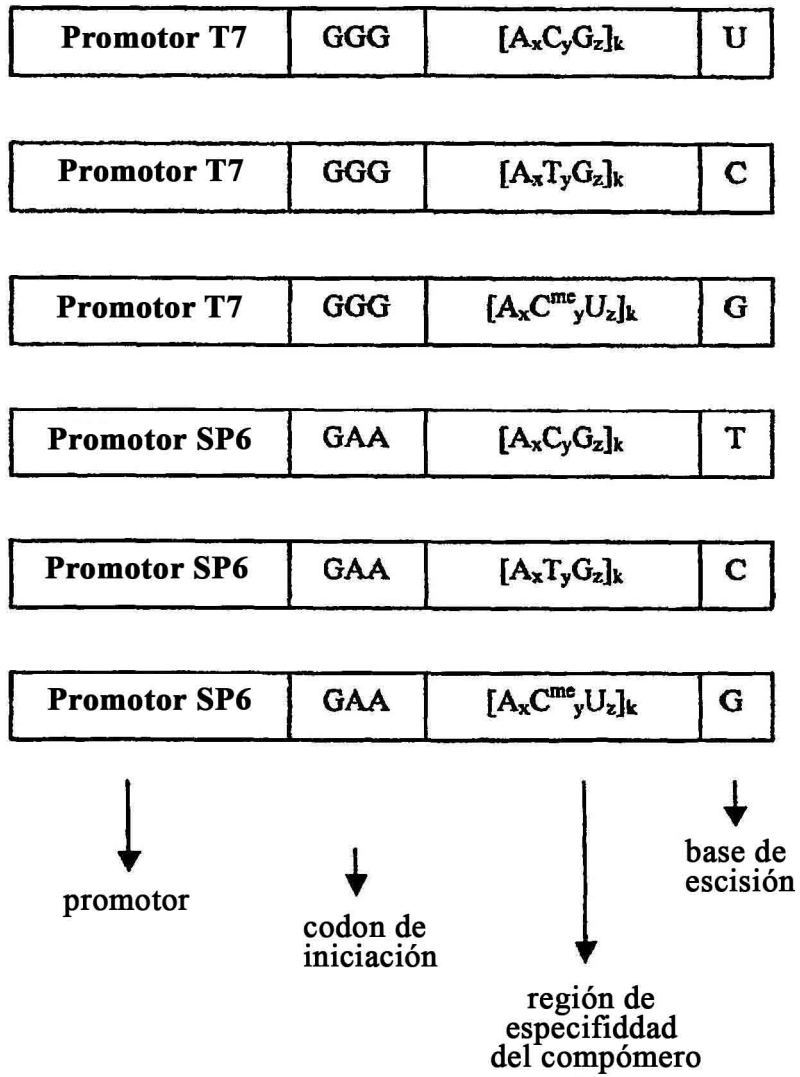


Figura 8

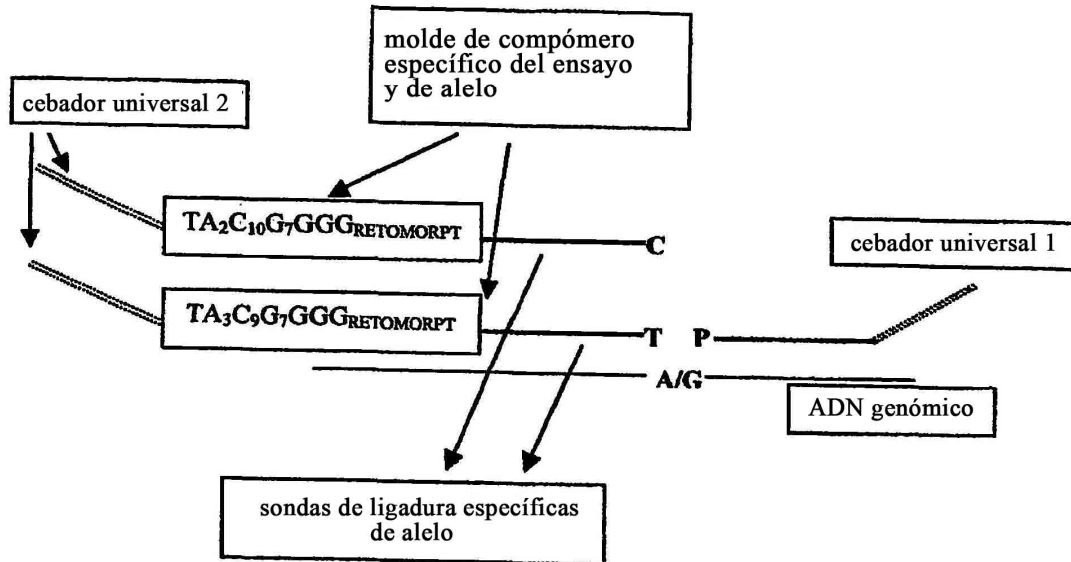


Figura 9A

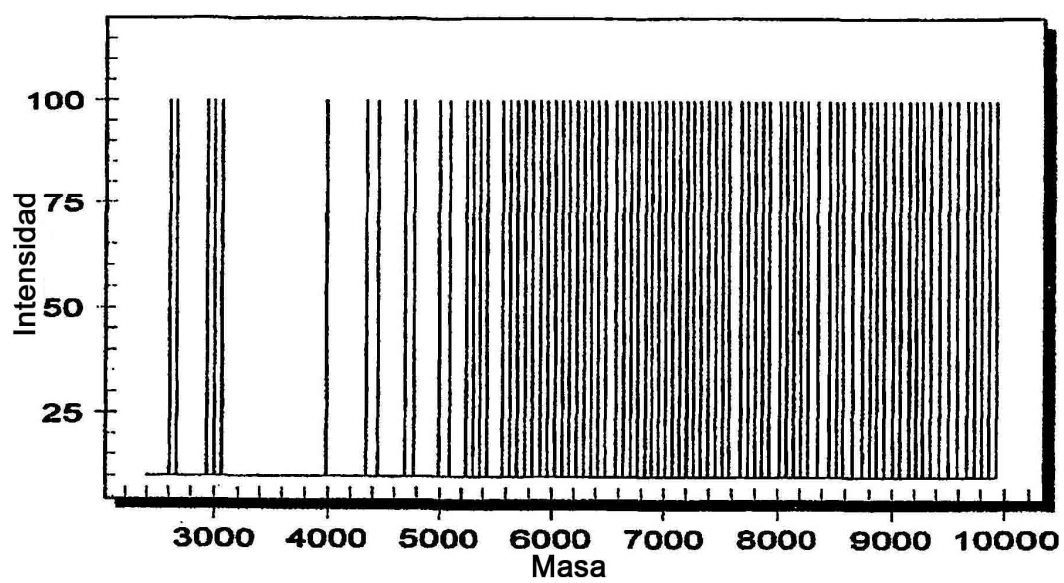


Figura 9B

Biblioteca de compómeros representativos

composición base del compómero	Longitud (en bases, después de la escisión)	Masa_natural (Dalton)
(rA7 rG0) rC	7	2609,65
(rA3 rG4) rC	7	2673,65
(rA8 rG0) rC	8	2938,86
(rA4 rG4) rC	8	3002,86
(rA0 rG8) rC	8	3066,86
(rA9 rG0) rC	9	3268,07
(rA5 rG4) rC	9	3332,07
(rA1 rG8) rC	9	3396,07
(rA0 rG11) rC	11	4102,48
(rA6 rG6) rC	12	4351,7
(rA0 rG12) rC	12	4447,69
(rA13 rG1) rC	14	4930,12
(rA6 rG8) rC	14	5042,12
(rA1 rG13) rC	14	5122,11
(rA15 rG0) rC	15	5243,33
(rA11 rG4) rC	15	5307,33
(rA7 rG8) rC	15	5371,33
(rA3 rG12) rC	15	5435,32
(rA16 rG0) rC	16	5572,54
(rA12 rG4) rC	16	5636,54
(rA8 rG8) rC	16	5700,53
(rA4 rG12) rC	16	5764,53
(rA0 rG16) rC	16	5828,53
(rA17 rG0) rC	17	5901,75
(rA13 rG4) rC	17	5965,75
(rA9 rG8) rC	17	6029,74
(rA5 rG12) rC	17	6093,74
(rA1 rG16) rC	17	6157,74
(rA18 rG0) rC	18	6230,96
(rA14 rG4) rC	18	6294,96
(rA10 rG8) rC	18	6358,95
(rA6 rG12) rC	18	6422,95
(rA2 rG16) rC	18	6486,95
(rA19 rG0) rC	19	6560,17
(rA15 rG4) rC	19	6624,17
(rA11 rG8) rC	19	6688,16

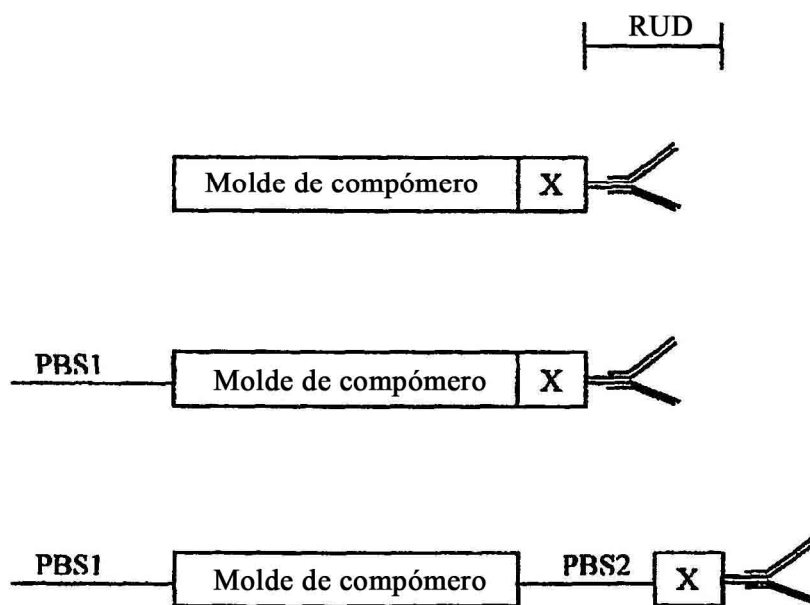
(rA7 rG12) rC	19	6752,16
(rA3 rG16) rC	19	6816,16
(rA20 rG0) rC	20	6889,38
(rA16 rG4) rC	20	6953,38
(rA12 rG8) rC	20	7017,37
(rA8 rG12) rC	20	7081,37
(rA4 rG16) rC	20	7145,37
(rA0 rG20) rC	20	7209,37
(rA18 rG3) rC	21	7266,59
(rA14 rG7) rC	21	7330,58
(rA10 rG11) rC	21	7394,58
(rA6 rG15) rC	21	7458,58
(rA2 rG19) rC	21	7522,58
(rA20 rG2) rC	22	7579,8
(rA16 rG6) rC	22	7643,79
(rA12 rG10) rC	22	7707,79
(rA8 rG14) rC	22	7771,79
(rA4 rG18) rC	22	7835,79
(rA22 rG1) rC	23	7893,01
(rA18 rG5) rC	23	7957,01
(rA14 rG9) rC	23	8021
(rA9 rG14) rC	23	8101
(rA5 rG18) rC	23	8165
(rA22 rG2) rC	24	8238,22
(rA18 rG6) rC	24	8302,21
(rA14 rG10) rC	24	8366,21
(rA8 rG16) rC	24	8462,21
(rA4 rG20) rC	24	8526,2
(rA22 rG3) rC	25	8583,43
(rA17 rG8) rC	25	8663,42
(rA12 rG13) rC	25	8743,42
(rA8 rG17) rC	25	8807,42
(rA26 rG0) rC	26	8864,64
(rA22 rG4) rC	26	8928,64
(rA18 rG8) rC	26	8992,63
(rA14 rG12) rC	26	9056,63
(rA7 rG19) rC	26	9168,62
(rA25 rG2) rC	27	9225,85
(rA21 rG6) rC	27	9289,84
(rA17 rG10) rC	27	9353,84
(rA13 rG14) rC	27	9417,84
(rA9 rG18) rC	27	9481,84
(rA5 rG22) rC	27	9545,83
(rA1 rG26) rC	27	9609,83
(rA17 rG11) rC	28	9699,05

(rA13 rG15) rC	28	9763,05
(rA9 rG19) rC	28	9827,04
(rA3 rG25) rC	28	9923,04
(rA20 rG9) rC	29	9996,26

Figura 9B (continuación)

Figura 10

reactivo de detección de dianas
resto de unión a Diana =
 anticuerpo



PBS = sitio de unión del cebador