

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 915**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2006 E 11188830 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2460893**

54 Título: **Detección múltiplex de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**20.06.2005 US 691834 P**

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

**18.12.2013**

73 Titular/es:

**ADVANCED CELL DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)  
3960 Point Eden Way  
Hayward CA 94545, US**

72 Inventor/es:

**LUO, YULING;  
MA, YUNQING y  
NGUYEN, CUNG-TUONG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 434 915 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

Detección múltiple de ácidos nucleicos

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud es una solicitud de patente de utilidad no provisional que reivindica la prioridad y se beneficia de la siguiente solicitud de patente provisional prioritaria: USSN 60/691.834, presentada el 20 de junio de 2005, titulada "Método de detección y recuento de células raras de poblaciones de células grandes heterogéneas" de Luo y Chen.

**Campo de la invención**

10 La presente invención pertenece al campo de la detección de ácidos nucleicos. La invención incluye métodos para la detección de ácidos nucleicos, incluidos los métodos de detección de la presencia de dos o más ácidos nucleicos de forma simultánea en una sola muestra. La solicitud también incluye composiciones y kits relacionados con estos métodos.

**Antecedentes de la invención**

15 El perfil de expresión génica global y otras tecnologías han identificado un gran número de genes cuya expresión está alterada, p. ej., en los tejidos enfermos o en los tejidos y las células tratadas con agentes farmacéuticos (Lockhart y Winzeler (2000) "Genomics, gene expression and ADN arrays" Nature 405:827-36 y Gunther et al. (2003) "Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro" Proc Natl Acad Sci USA 100:9608-13. Estos genes se están utilizando cada vez más como biomarcadores en el diagnóstico de enfermedades, estadificación y pronóstico (Golub et al. (1999) "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring" Science 286:531-7), identificación de dianas, validación y análisis de rutas (Roberts et al. (2000) "Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles" Science 287:873-80); rastreo de fármacos (Hamadeh et al. (2002) "Prediction of compound signature using high density gene expression profiling" Toxicol Sci 67:232-40 ); y estudios de eficacia de fármacos, relación estructura-actividad, toxicidad y interacciones fármaco - diana (Gerhold et al. (2001) "Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using ADN microarrays" Physiol Genomics 5:161-70 y Thomas et al. (2001) "Identification of toxicologically predictive gene sets using cADN microarrays" Mol Pharmacol 60:1189-94 ). A medida que se identifican biomarcadores, su implicación en el tratamiento de enfermedades y en el desarrollo de fármacos tendrá que ser evaluado para un mayor rendimiento y mayores poblaciones de las muestras. Por lo tanto, se necesitan tecnologías de análisis de la expresión génica más flexibles y sencillas que permitan el análisis de la expresión de múltiples genes con una mayor calidad de los datos y un mayor rendimiento.

30 Los niveles de expresión de ARN tradicionalmente se han medido utilizando Northern blot y ensayos de protección de nucleasa. Sin embargo, estos métodos levan mucho tiempo y tienen una sensibilidad limitada, y los datos generados son más cualitativos que cuantitativos en la naturaleza. Una mayor sensibilidad y cuantificación son posibles con los métodos basados en la reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), tal como la RT-PCR cuantitativa en tiempo real, pero estos enfoques tienen bajas capacidades múltiple (Bustin (2002) "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems" J Mol Endocrinol 29:23-39 y Bustin and Nolan (2004) "Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction" J Biomol Tech. 15:155-66 ). La tecnología de micromatrices se ha utilizado extensamente en investigación, pero su sensibilidad moderada y el procedimiento experimental relativamente largo han limitado su uso en las aplicaciones de perfiles de expresión de alto rendimiento (Epstein and Butow (2000) "Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge" Curr Opin Biotechnol. 11:36-41).

45 La mayoría de los métodos actuales de cuantificación del ARNm requieren el aislamiento de ARN, transcripción inversa y amplificación de la diana, introduciendo cada uno de ellos una variabilidad que conduce a una precisión global del ensayo baja. Recientemente, se ha informado de un ensayo de selección múltiple para la cuantificación del ARNm que combina la protección de nucleasa con la detección por red luminiscente (Martel et al. (2002) "Multiplexed screening assay for mRNA combining nuclease protection with luminescent array detection" Assay Drug Dev Technol. 1:61-71). Aunque este ensayo tiene la ventaja de la medición de transcritos de ARNm directamente a partir de lisados de células, se informa de que la sensibilidad del ensayo y la reproducibilidad son limitadas. También se informó de otro ensayo múltiple de ARNm sin la necesidad del aislamiento de ARN (Tian et al. (2004) "Multiplex mRNA assay using electrophoretic tags for high-throughput gene expression analysis" Nucleic Acids Res. 32:e126). Este ensayo asocia el ensayo de Invader® ARNm primario con pequeñas moléculas fluorescentes eTags que se pueden distinguir por electroforesis capilar por las diferentes relaciones de carga -masa de las eTags. Sin embargo, este ensayo requiere el uso de un grupo de sondas de señal eTagged especialmente diseñado y sintetizado, un equipo de electroforesis capilar complicado, y un paquete especial de análisis de datos.

55 Otra tecnología para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos diana es la tecnología de amplificación de la señal de ADN ramificado tal y como se describe en p. ej. Hartley et al. (Drug Metabolism and Disposition, 2000, vol. 28, No. 5, p. 608-616).

Entre otros aspectos, la presente invención proporciona métodos que superen las limitaciones indicadas anteriormente y permitan la detección rápida, sencilla, sensible y de múltiples ARNm (y/o otros ácidos nucleicos) de forma simultánea. Una comprensión completa de la invención se obtendrá después del análisis de lo siguiente.

**Compendio de la invención**

5 En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para la detección de los ácidos nucleicos de interés. Los ácidos nucleicos son capturados en un soporte sólido y luego detectados. También se describen aquí las composiciones, kits y sistemas relacionados con estos métodos.

10 Una primera clase general de realizaciones incluye los métodos de detección de dos o más ácidos nucleicos de interés. En estos métodos se proporcionan, una muestra que comprende o se sospecha que comprende los ácidos nucleicos de interés, dos o más subgrupos de m extensores marcadores, en la que m es por lo menos dos, y un sistema de marcaje de sondas. Cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. El sistema de marcaje de sondas comprende un marcador, y un componente del sistema de marcaje de sondas capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo.

15 Los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra son capturados en un soporte sólido. Cada ácido nucleico de interés capturado en el soporte sólido se hibrida con su correspondiente subgrupo de m extensores marcadores, y el sistema de marcaje de sonda se hibrida con los m extensores marcadores. A continuación, se detecta la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido. Dado que el marcador está asociado con el ácido nucleico de interés a través de la hibridación de los extensores marcadores y del sistema de marcaje de la sonda, se establece una correlación entre la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido y la presencia o ausencia del ácido nucleico de interés en el soporte sólido y por lo tanto en la muestra original.

25 En una clase de realizaciones, se proporciona una población combinada de las partículas que constituyen el soporte sólido. La población se compone de dos o más subgrupos de partículas, y una pluralidad de partículas de cada subgrupo se distingue de una pluralidad de partículas de cada uno de los otros subgrupos. Las partículas en cada subgrupo se han asociado con un tipo sonda de captura diferente. También se proporcionan dos o más subgrupos de n extensores de captura, en donde n es por lo menos dos. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra se hibrida con el correspondiente subgrupo de n extensores de captura y el subgrupo de n extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando de este modo el ácido nucleico del subgrupo de partículas con el que están asociados los extensores de captura.

35 Por lo general, en esta clase de realizaciones, se identifican por lo menos una parte de las partículas de cada subgrupo y se detecta la presencia o ausencia de marcaje en esas partículas. Dado que existe una correlación entre un subgrupo específico de partículas y un ácido nucleico de interés particular, los subgrupos de partículas que tienen el marcador presente indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

40 En otra clase de realizaciones, el soporte sólido comprende dos o más sondas de captura, donde cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Se proporcionan dos o más subgrupos de n extensores de captura, en donde n es por lo menos dos. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de n extensores de captura con una posición seleccionada en el soporte sólido. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra se hibrida con el subgrupo de n extensores de captura correspondiente y el subgrupo de n extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando así el ácido nucleico en el soporte sólido en la posición seleccionada con la que están asociados los extensores de captura.

45 Por lo general, en esta clase de formas de realizaciones, se detecta la presencia o ausencia del marcador en las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido. Dado que existe una correlación entre una posición particular en el soporte y un ácido nucleico de interés particular, las posiciones que presentan un marcador indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

50 Las diversas etapas de captura e hibridación pueden llevarse a cabo simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden conveniente. P. ej., en realizaciones en las que se emplean extensores de captura, cada ácido nucleico de interés puede hibridarse con el subgrupo de m extensores marcadores correspondiente y con el subgrupo de n extensores de captura correspondiente, y a continuación, los extensores de captura pueden hibridarse con las sondas de captura asociadas con el soporte sólido.

55 Estos métodos son útiles para la detección múltiple de ácidos nucleicos, opcionalmente detección altamente multiplexada. Por lo tanto, los dos o más ácidos nucleicos de interés (p. ej., los ácidos nucleicos que van a ser detectados) opcionalmente comprenden cinco o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o incluso

100 o más ácidos nucleicos de interés, mientras que los dos o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden cinco o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o incluso 100 o más subgrupos de m extensores marcadores. En realizaciones en las que se utilizan extensores de captura, soportes sólidos en partículas, y/o soportes sólidos espacialmente direccionables, se proporcionan un número similar de subgrupos de  
5 extensores de captura, subgrupos de partículas, y/o posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido.

El sistema de sonda de marcaje incluye opcionalmente un preamplificador, un multímero de amplificación, y una sonda de marcaje, en el que el pre-amplificador es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos, dos de los extensores marcaje m y con una pluralidad de multímeros de amplificación, y en el que el multímero de amplificación es capaz de hibridarse simultáneamente con el preamplificador y con una pluralidad de sondas  
10 marcadoras. En una clase de realizaciones, la sonda marcadora comprende el marcador.

En un aspecto, el marcador es un marcador fluorescente. La detección de la presencia del marcador en las partículas comprende de este modo la detección de una señal fluorescente del marcador. Estos métodos se pueden usar opcionalmente para cuantificar las cantidades de los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra. P. ej., en una clase de realizaciones, se mide una intensidad de señal del marcador, p. ej., para cada subgrupo de  
15 partículas o la posición seleccionada en el soporte sólido, y se relacionó con la cantidad del ácido nucleico de interés correspondiente presente.

Como se señaló anteriormente, un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Generalmente, el componente del sistema de sonda marcadora que se hibrida con los dos o más extensores marcadores es un multímero de amplificación o preamplificador. Por lo tanto, en un aspecto, el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación o preamplificador, siendo el multímero de amplificación o preamplificador capaz de hibridarse con los por lo menos dos extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se hibrida con los m extensores marcadores a una temperatura de hibridación, siendo la temperatura de hibridación mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  del complejo formado por cada extensor marcador individual y el multímero de amplificación o preamplificador. La temperatura de hibridación es generalmente alrededor de 5° C o superior que la  $T_m$ , p. ej., aproximadamente 7° C o superior, aproximadamente 10° C o superior, aproximadamente 12° C o superior, aproximadamente 15° C o superior, aproximadamente 17° C o superior, o incluso aproximadamente 20° C o superior que la  $T_m$ .

Cada extensor marcador comprende generalmente una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora. En una clase de realizaciones, los m extensores marcadores de un subgrupo tienen L-1 5' de L-2 o tienen cada uno tiene L-1 3' de L-2. La longitud de L-2 puede variar. P. ej., la secuencia de L-2 puede tener una longitud de 20 nucleótidos o menos, p. ej., L-2 puede tener de 9 y 17 nucleótidos de longitud o de 12 y 15 o de 13 y 15 nucleótidos de longitud.  
35

En cualquiera de las distintas etapas, los materiales no capturados en el soporte sólido se separan opcionalmente del soporte. P. ej., después de la hibridación de los ácidos nucleicos, de los extensores marcadores, de las sondas de bloqueo opcionales, de los extensores de captura opcionales, y de las sondas de captura unidas al soporte opcionales, el soporte se lava opcionalmente para eliminar los ácidos nucleicos y las sondas no unidas; después de la hibridación de los extensores marcadores y del multímero de amplificación opcional, el soporte opcionalmente se lava para eliminar multímero de amplificación no unido, y/o después de la hibridación de las sondas marcadoras con el multímero de amplificación, el soporte se lava opcionalmente para eliminar la sonda marcadora no unida antes de la detección del marcador.  
40

Estos métodos se pueden utilizar para detectar la presencia de los ácidos nucleicos de interés básicamente en cualquier tipo de muestra. Por ejemplo, la muestra puede proceder de un animal, un ser humano, una planta, una célula cultivada, un virus, una bacteria, un patógeno, y/o un microorganismo. La muestra incluye, opcionalmente, un lisado celular, un fluido intercelular, un fluido corporal (incluyendo, pero no limitándose a, sangre, suero, saliva, orina, esputo, o líquido cefalorraquídeo), y/o un medio de cultivo acondicionado, y puede proceder opcionalmente de un tejido (p. ej., un homogeneizado de tejido), una biopsia, y/o un tumor. Del mismo modo, los ácidos nucleicos pueden ser básicamente cualquier ácido nucleico deseado. A modo de ejemplo, los ácidos nucleicos de interés pueden proceder de uno o más animales, de un ser humano, de una planta, de una célula cultivada, de un microorganismo, de un virus, de una bacteria, o de un patógeno. En una clase de realizaciones, los dos o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ARNm.  
45

La solicitud describe una composición para la detección de dos o más ácidos nucleicos de interés. En un aspecto, la composición incluye una población combinada de partículas. La población se compone de dos o más subgrupos de partículas, con una pluralidad de las partículas en cada subgrupo distinguible de una pluralidad de partículas de cada otro subgrupo. Las partículas en cada subgrupo están asociadas con una sonda de captura diferente. En otro aspecto, la composición incluye un soporte sólido que comprende dos o más sondas de captura, donde cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido.  
55

La composición también incluye dos o más subgrupos de n extensores de captura, en donde n es por lo menos dos, dos o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador, en el que un componente del sistema de la sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas o con una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Del mismo modo, cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés.

5  
10  
15

Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador ; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores ; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares. La composición incluye opcionalmente por lo menos uno de los ácidos nucleicos de interés.

La solicitud describe un kit para la detección de dos o más ácidos nucleicos de interés. En un aspecto, el kit incluye una población combinada de partículas. La población comprende dos o más subgrupos de partículas, con una pluralidad de partículas de cada subgrupo que se distinguen de una pluralidad de partículas de cada otro subgrupo. Las partículas en cada subgrupo están asociadas a una sonda de captura diferente. En otro aspecto, el kit incluye un soporte sólido que comprende dos o más sondas de captura, en el que cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido.

20

El kit también incluye dos o más subgrupos de n extensores de captura, en donde n es por lo menos dos, dos o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador, en el que un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los extensores marcadores m de un subgrupo. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y por lo tanto asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas o con una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Del mismo modo, cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. Los componentes del kit se envasan en uno o más recipientes.

25  
30

Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador ; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores ; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

35

Otra clase general de realizaciones proporciona métodos de detección de uno o más ácidos nucleicos utilizando una configuración de extensor marcador novedosa. En estos métodos, se proporciona una muestra que comprende o se sospecha que comprende los ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de m extensores marcadores, en la que m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora. Cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. El sistema de sonda marcadora que comprende un marcador, y un componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., un pre-amplificador o un múltiplo de amplificación) es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Cada extensor marcador comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora, y en la menos dos extensores marcadores (p. ej., los m extensores marcadores de un subgrupo) tienen cada uno L-1 5'de L-2 o tienen cada uno L-1 3' de L-2.

40  
45  
50

Los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra son capturados en un soporte sólido. Cada ácido nucleico de interés capturado en el soporte sólido se hibrida con el subgrupo de extensores m de marcaje correspondiente, y el sistema de sonda marcadora se hibrida con los m extensores marcadores a una temperatura de hibridación. La temperatura de hibridación es mayor que la temperatura de fusión Tm de un complejo entre cada extensor marcador individual y el componente del sistema de sonda marcadora. A continuación, se detecta la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido. Dado que el marcador está asociado con el ácido nucleico de interés mediante hibridación de los extensores marcadores y el sistema de sonda marcadora, se establece una correlación entre la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido y la presencia o ausencia del ácido nucleico de interés en el soporte sólido y por lo tanto en la muestra original.

55  
60

Generalmente, el o los ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, y el o los subgrupos de  $m$  extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores.

En cuanto a los métodos descritos anteriormente, básicamente cualquier soporte sólido adecuado puede ser empleado. Por ejemplo, el soporte sólido puede comprender partículas tales como microesferas, o puede comprender un soporte prácticamente plano y/o espacialmente direccionable. Los diferentes ácidos nucleicos son capturados opcionalmente por diferentes subgrupos de partículas distinguibles o en diferentes posiciones en un soporte sólido espacialmente direccionable. Los ácidos nucleicos de interés pueden ser capturados por el soporte sólido por diversas técnicas, p. ej., por unión directamente al soporte sólido o por unión a un resto unido al soporte, o por medio de la hibridación con otro ácido nucleico unido al soporte sólido. Preferiblemente, los ácidos nucleicos son capturados por el soporte sólido mediante la hibridación con los extensores de captura y las sondas de captura.

En una clase de realizaciones en la que uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés y uno o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores, se proporciona una población combinada de partículas que constituyen el soporte sólido. La población comprende dos o más subgrupos de partículas, y una variedad de partículas de cada subgrupo se distingue de una variedad de partículas de cada otro subgrupo. Las partículas de cada subgrupo se han asociado con una sonda de captura diferente.

También se proporcionan dos o más subgrupos de  $n$  extensores de captura, en donde  $n$  es por lo menos dos,. Cada subgrupo de  $n$  extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de  $n$  extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presente en la muestra se hibrida con el correspondiente subgrupo de  $n$  extensores de captura y el subgrupo de  $n$  extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando así el ácido nucleico en el subgrupo de partículas con el que los extensores de captura están asociados.

Por lo general, en esta clase de realizaciones, se identifican por lo menos una parte de las partículas de cada subgrupo y se detecta la presencia o ausencia de marcador en esas partículas. Dado que existe una correlación entre un subgrupo específico de partículas y un ácido nucleico de interés particular, los subgrupos de partículas que tienen el marcador presente indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

En otras formas de realización en las que uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés y uno o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores, los ácidos nucleicos son capturados en diferentes posiciones en un soporte no particulado, espacialmente direccionable. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, el soporte sólido comprende dos o más sondas de captura, en donde cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Se proporcionan dos o más subgrupos de  $n$  extensores de captura, en donde  $n$  es por lo menos dos. Cada subgrupo de los  $n$  extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de  $n$  extensores de captura con una posición seleccionada en el soporte sólido. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra se hibrida con el subgrupo de  $n$  extensores de captura correspondiente y el subgrupo de  $n$  extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando así el ácido nucleico en el soporte sólido en la posición seleccionada con la que los extensores de captura están asociados.

Por lo general, en esta clase de realizaciones, se detecta la presencia o ausencia del marcador en las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido. Dado que existe una correlación entre una posición concreta en el soporte y un ácido nucleico de interés concreto, las posiciones que tiene un marcador presente indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

Otra clase general de realizaciones proporciona una composición para la detección de uno o más ácidos nucleicos de interés. La composición incluye un soporte sólido que comprende una o más sondas de captura, uno o más subgrupos de  $n$  extensores de captura, en donde  $n$  es por lo menos dos, uno o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores, en donde  $m$  es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador. Cada subgrupo de  $n$  extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de  $n$  extensores de captura con el soporte sólido. Cada subgrupo de  $m$  extensores

5 marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. Un componente del sistema de sonda marcadora (p. ej. un preamplificador o multímero de amplificación) es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Cada extensor marcador comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora, y los m extensores marcadores de un subgrupo tienen cada uno L-1 5' de L-2 o tienen cada uno L-1 3' de L-2.

10 En una clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más grupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende una población combinada de partículas. La población comprende dos o más subgrupos de partículas. Una pluralidad de las partículas de cada subgrupo se distinguen de una pluralidad de las partículas de otro subgrupo, y las partículas de cada subgrupo se asocian con una sonda de captura diferente. Los extensores de captura en cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas.

15 En otra clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende dos o más sondas de captura, en donde cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con una posición seleccionada sobre el soporte sólido.

20 Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

25 Por ejemplo, el sistema de sonda marcadora puede incluir un multímero de amplificación o un preamplificador, donde el multímero de amplificación o el preamplificador son capaces de hibridarse con por lo menos dos extensores marcadores. La composición incluye opcionalmente uno o más ácidos nucleicos de interés, en donde cada ácido nucleico de interés se hibrida con el subgrupo de m extensores marcadores correspondiente y con el subgrupo de n extensores de captura correspondiente, que a su vez se hibrida con la sonda de captura correspondiente. El multímero de amplificación o el preamplificador se hibrida con los m extensores marcadores. La composición se mantiene a una temperatura de hibridación mayor que una temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo formado por un extensor marcador individual y el multímero de amplificación o el preamplificador (p. ej., aproximadamente 5°C o superior, aproximadamente 7°C o superior, aproximadamente 10°C o superior, aproximadamente 12°C o superior, aproximadamente 15°C o superior, aproximadamente 17°C o superior, o aproximadamente 20°C o superior que la  $T_m$ ).

30 La solicitud describe un kit para la detección de uno o más ácidos nucleicos de interés. El kit incluye un soporte sólido que comprende una o más sondas de captura, uno o más subgrupos de n extensores de captura, donde n es por lo menos dos, uno o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con el soporte sólido. Cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. Un componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., un preamplificador o multímero de amplificación) es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Cada extensor marcador comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora, y los m extensores marcadores de un subgrupo tienen cada uno L-1 5' de L-2 o L-1 3' de L-2. Los componentes del kit se envasan en uno o más recipientes. El kit también incluye opcionalmente instrucciones para usar el kit para capturar y detectar los ácidos nucleicos de interés, una o más soluciones amortiguadoras (p. ej., amortiguador de lisis, diluyente, amortiguador de hibridación, y/o amortiguador de lavado), estándares que comprenden uno o más ácidos nucleicos a una concentración conocida, y/o similares.

35 Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura,

extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores ; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

5 Por ejemplo, en una clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más grupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende una población combinada de partículas. La población se compone de dos o más subgrupos de partículas. Una pluralidad de las partículas de cada subgrupo se distinguen de una pluralidad de las partículas de otro subgrupo, y las partículas de cada subgrupo se asocian con una sonda de captura diferente. Los extensores de captura en cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas.

10 En otra clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende dos o más sondas de captura, en el que cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con una posición seleccionada sobre el soporte sólido.

15 Sin embargo, otra clase general de realizaciones proporciona métodos de captura de un marcador para un primer ácido nucleico de interés en un ensayo múltiple en donde se detectan dos o más ácidos nucleicos de interés. En estos métodos se proporciona una muestra que comprende el primer ácido nucleico de interés y que también comprende o se sospecha que comprenda uno o más de los otros ácidos nucleicos de interés. Se proporciona un primer subgrupo de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y también un sistema de sonda marcadora que comprende el marcador. El primer subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con el primer ácido nucleico de interés, y un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores del primer subgrupo. El primer ácido nucleico de interés se hibrida con el primer subgrupo de m extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se hibrida con los m extensores marcadores, capturando así el marcador para el primer ácido nucleico de interés.

20 Básicamente todas las características observadas para las formas de realización anteriores se aplican también a estos métodos, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la configuración de los extensores marcadores, número de extensores marcadores por subgrupo, composición del sistema de sonda marcadora, tipo de marcador, número de ácidos nucleicos de interés, fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos; y/o similares.

25 Sin embargo, otra clase general de realizaciones proporciona métodos de capturar un marcador de un ácido nucleico de interés. En estos métodos, se proporcionan m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos. Los m extensores marcadores son capaces de hibridarse con el ácido nucleico de interés. También se proporciona un sistema de sonda marcadora que comprende el marcador. Un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores. Cada extensor marcador comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria con una secuencia del polinucleótido del ácido nucleico de interés y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria con una secuencia del polinucleótido del componente del sistema de sonda marcadora, y los m extensores marcadores cada uno tiene L-1 5' de L-2 o donde los m extensores marcadores tienen cada uno L-1 3' de L-2. El ácido nucleico de interés se hibrida con los m extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se hibrida con los m extensores marcadores a una temperatura de hibridación, capturando así el marcador del ácido nucleico de interés. Preferiblemente, la temperatura de hibridación es mayor que una temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo formado por cada extensor marcador individual y el componente del sistema de sonda marcadora.

30 Básicamente todas las características observadas para las formas de realización anteriores también se aplican a estos métodos, como relevantes; p. ej., con respecto a la configuración de los extensores marcadores, número de extensores marcadores por subgrupo, composición del sistema de sonda marcadora, tipo de marcador; y/o similares.

### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1** ilustra esquemáticamente un ensayo ADN<sub>b</sub> estándar típico.

35 **Figura 2 Secciones A-E** representa esquemáticamente un ensayo de detección de ácido nucleico multiplex, en el que los ácidos nucleicos de interés son capturados en subgrupos distinguibles de microesferas y posteriormente detectados.



**Figura 3 Secciones A-D** representa esquemáticamente un ensayo de detección de ácido nucleico multiplex, en el que los ácidos nucleicos de interés son capturados en posiciones seleccionadas sobre un soporte sólido y detectados posteriormente. La **Sección A** muestra una vista superior del soporte sólido, mientras que las **Secciones B-D** muestran el soporte en sección transversal.

- 5 **Figura 4 Sección A** representa esquemáticamente una configuración del extensor marcador en doble Z. La **Sección B** muestra esquemáticamente una configuración del extensor marcador cruciforme. La **Sección C** representa un gráfico de barras que compara la luminiscencia observada en los ensayos ADN<sub>b</sub> utilizando los extensores marcadores en doble Z o extensores marcadores cruciformes.

Los esquemas de las figuras no son necesariamente a escala.

## 10 Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. Las siguientes definiciones son complementarias de las del estado de la técnica y están dirigidas a esta solicitud concreta y no para ser atribuidas a cualquier caso relacionado o no relacionado, p. ej., a cualquier patente o solicitud de ordinaria. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden ser utilizados en la práctica para el ensayo de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en este documento. En consecuencia, la terminología usada en este documento es a efectos de describir las solamente realizaciones particulares, y no para ser limitante.

20 Tal como se utiliza descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” “el” y “la” incluyen plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, p. ej., la referencia a “una molécula” incluye una pluralidad de tales moléculas, y similares.

El término “aproximadamente” se utiliza en esta memoria para indicar el valor de una cantidad dada que varía  $\pm 10$  % del valor, o opcionalmente  $\pm 5$  % del valor, o en algunas formas de realización,  $\pm 1$  % del valor así descrito.

25 El término “polinucleótido” (y el término equivalente “ácido nucleico”) abarca cualquier cadena física de unidades de monómeros que pueden corresponder a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (p. ej., un polímero de ADN o de ARN típico), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), oligonucleótidos modificados (p. ej., oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no son ARN o ADN biológicos típicos, tales como oligonucleótidos 2'-O- metilados), y similares. Los nucleótidos del polinucleótido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de nucleótidos, pueden ser naturales o no naturales, y pueden ser no sustituidos, no modificados, sustituidos o modificados. Los nucleótidos pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster, o por enlaces de fosforotioato, enlaces metilfosfonato, enlaces boranofosfato, o similares. El polinucleótido puede comprender adicionalmente elementos no nucleotídicos tales como marcadores, apagadores, grupos de bloqueo, o similares. El polinucleótido puede ser, p. ej., de cadena sencilla o de doble cadena.

35 Una “secuencia de polinucleótido” o una “secuencia de nucleótidos” es un polímero de nucleótidos (un oligonucleótido, un ADN, un ácido nucleico, etc) o una cadena de caracteres que representa un polímero de nucleótidos, dependiendo del contexto. A partir de cualquier secuencia de polinucleótidos especificada, se puede determinar ya sea el ácido nucleico dado o la secuencia de polinucleótidos complementaria (p. ej., el ácido nucleico complementario).

40 Dos polinucleótidos se “hibridan” cuando se asocian para formar un ácido nucleico de doble cadena estable, p. ej., en condiciones de ensayo adecuadas. Los ácidos nucleicos hibridan debido a una variedad de fuerzas físico-químicas bien caracterizadas, tales como enlaces de hidrógeno, exclusión de disolvente, apilamiento de bases y similares. Una guía amplia para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) “Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes”, parte I capítulo 2, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays” (Elsevier, New York), así como en Ausubel, *infra*.

45 La “ $T_m$ ” (temperatura de fusión) de una doble cadena de ácido nucleico en las condiciones especificadas (p. ej., condiciones de ensayo adecuadas) es la temperatura a la cual la mitad de los pares de bases en una población de ácidos nucleicos de doble cadena están disociados y la mitad están asociados. La  $T_m$  de un ácido nucleico de doble cadena concreto, se puede calcular y/o medir, p. ej., mediante la obtención de una curva de desnaturalización térmica de los ácidos nucleicos de doble cadena (donde la  $T_m$  es la temperatura correspondiente al punto medio de la transición observada desde la forma de doble cadena a la de cadena sencilla).

50 El término “complementario” se refiere a un polinucleótido que forma una doble cadena estable con su “complemento”, p. ej., en condiciones de ensayo adecuadas. Generalmente, dos secuencias de polinucleótidos que son complementarias entre sí tienen desajustes en menos de aproximadamente 20 % de las bases, en menos de aproximadamente 10 % de las bases, preferiblemente en menos de aproximadamente el 5 % de las bases, y más preferiblemente no tienen desajustes.

Un "extensor de captura" o "CE" es un polinucleótido que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico de interés y con una sonda de captura. El extensor de captura generalmente tiene una primera secuencia de polinucleótidos C-1, que es complementaria con la sonda de captura, y una segunda secuencia de polinucleótidos C-3, que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés. Las secuencias C-1 y C-3 generalmente no son complementarias entre sí. El extensor de captura es preferentemente de cadena sencilla.

Una "sonda de captura" o "CP" es un polinucleótido que es capaz de hibridarse con por lo menos un extensor de captura y que está fuertemente unida (p. ej., covalentemente o no covalentemente, directamente o a través de un enlace, p. ej., estreptavidina-biotina o similares) a un soporte sólido, un soporte sólido espacialmente direccionable, una portaobjetos, una lámina, una microesfera, o similares. La sonda de captura comprende generalmente por lo menos una secuencia de polinucleótidos C-2 que es complementaria a la secuencia de polinucleótidos C-1 de por lo menos un extensor de captura. La sonda de captura es preferentemente de cadena sencilla.

Un "extensor marcador" o "LE" es un polinucleótido capaz de hibridarse con un ácido nucleico de interés y con un sistema de sonda marcadora. El extensor marcador tiene generalmente una primera secuencia de polinucleótidos L-1, que es complementaria de una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés, y una segunda secuencia de polinucleótidos L-2, que es complementaria de una secuencia de polinucleótidos del sistema de sonda marcadora (p. ej., L-2 puede ser complementaria de una secuencia de polinucleótidos de un múltiplo de amplificación, un preamplificador, una sonda marcadora, o similares). El extensor marcador es preferentemente de cadena sencilla.

Un "marcador" es un resto que facilita la detección de una molécula. Los marcadores comunes en el contexto de la presente invención son fluorescentes, luminiscentes, de dispersión de luz y/o marcadores colorimétricos. Los marcadores adecuados incluyen enzimas y restos fluorescentes, así como radionúclidos, sustratos, cofactores, inhibidores, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Entre las patentes que enseñan el uso de tales marcadores se incluyen las patentes de EE.UU Nos. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149, y 4.366.241. Muchos marcadores están disponibles comercialmente y se pueden utilizar en el contexto de la invención.

Un "sistema de sonda marcadora" comprende uno o más polinucleótidos que comprenden colectivamente un marcador y por lo menos dos secuencias de polinucleótidos M-1, cada uno de los cuales es capaz de hibridarse con un extensor marcador. El marcador proporciona una señal, directa o indirectamente. La secuencia de los polinucleótidos M-1 es generalmente complementaria a la secuencia L-2 de los extensores marcadores. Por lo menos dos secuencias de polinucleótidos M-1 son secuencias opcionalmente secuencias idénticas o diferentes. El sistema de sonda marcadora puede incluir una pluralidad de sondas marcadoras (p. ej., una pluralidad de sondas de marcadoras idénticas) y un múltiplo de amplificación; que opcionalmente también incluye un preamplificador o similar, u, opcionalmente, incluye sólo las sondas marcadoras, por ejemplo.

Un "múltiplo de amplificación" es un polinucleótido que comprende una pluralidad de secuencias de polinucleótidos M-2, por lo general (pero no necesariamente) secuencias de polinucleótidos M-2 idénticas. La secuencia de polinucleótidos M-2 es complementaria de una secuencia de polinucleótidos de la sonda marcadora. El múltiplo de amplificación incluye también por lo menos una secuencia de polinucleótidos capaz de hibridarse con un extensor marcador o con un ácido nucleico que se hibrida con el extensor marcador, p. ej., un preamplificador. Por ejemplo, el múltiplo de amplificación incluye, opcionalmente, por lo menos una (y preferiblemente por lo menos dos) secuencia de polinucleótidos M-1, opcionalmente secuencias M-1 idénticas; la secuencia de polinucleótidos M-1 es generalmente complementaria a la secuencia de polinucleótidos L-2 de extensor marcador. Del mismo modo, el múltiplo de amplificación incluye opcionalmente por lo menos una secuencia de polinucleótido que es complementario de una secuencia de polinucleótidos del preamplificador. El múltiplo de amplificación puede ser, p. ej., ácido nucleico lineal o ramificado. Como se ha indicado para todos los polinucleótidos, el múltiplo de amplificación puede incluir nucleótidos modificados y/o enlaces entre nucleótidos no estándar, así como desoxirribonucleótidos estándar, ribonucleótidos, y/o enlaces fosfodiéster. Los múltiplos de amplificación adecuados se describen, p. ej., en los documentos de patente EE.UU 5.635.352, EE.UU 5.124.246, EE.UU 5.710.264 y EE.UU 5.849.481.

Una "sonda marcadora" o "LP" es un polinucleótido monocatenario que comprende un marcador (u opcionalmente, que está configurado para unirse a un marcador) que directa o indirectamente proporciona una señal detectable. La sonda marcadora comprende generalmente una secuencia de polinucleótidos que es complementaria de la secuencia de polinucleótidos M - 2 repetida del múltiplo de amplificación, sin embargo, si no se utiliza múltiplo de amplificación en el ensayo de ADN, la sonda marcadora puede, p. ej., hibridarse directamente con un extensor marcador.

Un "preamplificador" es un ácido nucleico que sirve de intermediario entre uno o más extensores marcadores y los múltiplos de amplificación. Generalmente, el pre-amplificador es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos extensores marcadores y a una pluralidad de múltiplos de amplificación.

Un “microesfera” es una partícula pequeña esférica, o más o menos esférica. Una microesfera tiene generalmente un diámetro inferior a aproximadamente 1000 micrómetros (p. ej., inferior a aproximadamente 100 micrómetros, opcionalmente inferior a aproximadamente 10 micrómetros).

5 Un “microorganismo” es un organismo de tamaño microscópico o submicroscópico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, hongos, levaduras, protozoos, algas microscópicas (p. ej., algas unicelulares), virus (que se incluyen generalmente en esta categoría, aunque no son capaces de crecer y la reproducirse fuera de células huésped), agentes subvirales, viroides, y micoplasmas.

10 Una primera secuencia de polinucleótidos que se encuentra “5' de” una segunda secuencia de polinucleótidos de una cadena de ácido nucleico está situada más cerca del extremo 5' de la cadena de la segunda secuencia de polinucleótidos. Del mismo modo, una primera secuencia de polinucleótidos que se encuentra “3' de” una segunda secuencia de polinucleótidos en una cadena de ácido nucleico está situada más cerca del extremo 3' de la cadena de la segunda secuencia de polinucleótidos.

Varios términos adicionales están definidos o caracterizados en la presente memoria.

### Descripción detallada

15 La presente invención proporciona métodos, composiciones y kits para la detección de ácidos nucleicos, en particular para detección múltiple. Los ácidos nucleicos de interés son capturados en un soporte sólido y, a continuación se detectan, preferiblemente en un ensayo de ADN de cadena ramificada.

20 La tecnología de amplificación de la señal de cadena ramificada de ADN (ADNb) se ha utilizado, p. ej., para detectar y cuantificar transcritos de ARNm en líneas celulares y para determinar las cargas virales en la sangre. El ensayo de ADNb es un procedimiento de hibridación sándwich de ácidos nucleicos que permite la medición directa de la expresión del ARNm, p. ej., a partir de lisado celular bruto. Se proporciona la cuantificación directa de moléculas de ácido nucleico a niveles fisiológicos. Varias ventajas de la tecnología la distinguen de otras tecnologías de amplificación de ADN/ARN, incluyendo la amplificación lineal, una buena sensibilidad y el rango dinámico, gran precisión y exactitud, procedimiento de preparación de la muestra simple, y variación de muestra a muestra reducida.

25 En resumen, en un ensayo de ADNb típico para el análisis de la expresión génica (**Figura 1**), un ARNm diana cuya expresión se va a detectar se libera de las células y es capturado por una Sonda de Captura (CP) sobre una superficie sólida (p. ej., un pocillo de una placa de microtitulación) por medio de sondas de oligonucleótidos sintéticos llamadas extensores de captura (CE). Cada extensor de captura tiene una primera secuencia de polinucleótidos que puede hibridarse con el ARNm diana y una segunda secuencia de polinucleótidos que puede hibridarse con la sonda de captura. Generalmente, se utilizan dos o más extensores de captura. Sondas de otro tipo, denominadas extensores marcadores (LE), hibridan con diferentes secuencias en el ARNm diana y con secuencias en un multímero de amplificación. Además, las sondas de bloqueo (BP), que hibridan con las regiones del ARNm diana no ocupadas por CE o LE, se utilizan a menudo para reducir la unión de la sonda a una diana no específica.

30 Una grupo de sondas para un ARNm dado consta por lo tanto de CE, LE, y opcionalmente BP para el ARNm diana. Los CE, LE, y BP son complementarios con secuencias que no se solapan en el ARNm diana, y son generalmente, pero no necesariamente, contiguos.

35 La amplificación de la señal comienza con la unión de LE al ARNm diana. Después generalmente el multímero de amplificación se hibrida con LE. El multímero de amplificación tiene múltiples copias de una secuencia que es complementaria de una sonda marcadora (vale la pena señalar que el multímero de amplificación es generalmente, pero no necesariamente, un ácido nucleico de cadena ramificada, por ejemplo, el multímero de amplificación puede ser un ácido nucleico ramificado, en forma de horquilla, o de peine o un ácido nucleico lineal). Un marcador, p. ej., la fosfatasa alcalina, se une covalentemente a cada sonda marcadora. (Alternativamente, el marcador puede no estar covalentemente unido a las sondas marcadoras.) En la etapa final, los complejos marcados se detectan, p. ej., por la degradación de la fosfatasa alcalina - mediada de por sustrato quimioluminigenico, p. ej., dioxetano. La luminiscencia se presenta como unidad de luz relativa (RLU) en un lector de microplacas. La cantidad de quimioluminiscencia es proporcional al nivel de ARNm expresado por del gen diana.

40 En el ejemplo anterior, el multímero de amplificación y las sondas marcadoras comprenden un sistema de sonda marcadora. En otro ejemplo, el sistema de sonda marcadora comprende también un preamplificador, p. ej., como se describe en los documentos de patente EE.UU. 5.635.352 y EE.UU. 5.681.697, que además amplifican la señal de un solo ARNm diana. También en otro ejemplo, los extensores marcadores hibridan directamente con las sondas marcadoras y no se utiliza multímero de amplificación o preamplificador, de este modo la señal procedente de una molécula de ARNm diana se amplifica solamente con el grupo de extensores marcadores distintos que hibridan con el ARNm.

45 Los ensayos de ADNb básicos se han descrito convenientemente. Véanse, p. ej., los documentos EE.UU. 4.868.105 de Urdea et al. de título “Solution phase nucleic acid sandwich assay”; EE.UU. 5.635.352 de Urdea et al. de título “Solution phase nucleic acid sandwich assays having reduced background noise”; EE.UU. 5.681.697 a Urdea et al.

de título "Solution phase nucleic acid sandwich assays having reduced background noise and kits therefor"; EE.UU. 5.124.246 de Urdea et al. de título "Nucleic acid multimers and amplified nucleic acid hybridization assays using same"; EE.UU. 5.624.802 de Urdea et al. de título "Nucleic acid multimers and amplified nucleic acid hybridization assays using same"; EE.UU. 5.849.481 de Urdea et al. de título "Nucleic acid hybridization assays employing large comb-type branched polynucleotides"; EE.UU. 5.710.264 de Urdea et al. de título "Large comb type branched polynucleotides"; EE.UU. 5.594.118 de Urdea y Horn de título "Modified N-4 nucleotides for use in amplified nucleic acid hybridization assays"; EE.UU. 5.093.232 de Urdea y Horn de título "Nucleic acid probes"; EE.UU. 4.910.300 de Urdea y Horn titulada "Method for making nucleic acid probes"; EE.UU. 5.359.100, EE.UU. 5.571.670, EE.UU. 5.614.362, EE.UU. 6.235.465, EE.UU. 5.712.383, EE.UU. 5.747.244, EE.UU. 6.232.462, EE.UU. 5.681.702, EE.UU. 5.780.610, EE.UU. 5.780.227 de Sheridan et al. de "Oligonucleotide probe conjugated to a purified hydrophilic alkaline phosphatase and uses thereof"; EE.UU. N ° de publicación de solicitud de patente EE.UU 2002172950 de Kenny et al. de título "Highly sensitive gene detection and localization using in situ branched-ADN hybridization"; Wang et al. (1997) "Regulation of insulin preRNA splicing by glucose" Proc Nat Acad Sci EE.UU 94:4360-4365; Collins et al. (1998) "Branched ADN (bADN) technology for direct quantification of nucleic acids: Design and performance" in Gene Quantification, F Ferre, ed .; y Wilber y Urdea (1998) "Quantification of HCV RNA in clinical specimens by branched ADN (bADN) technology" Methods in Molecular Medicine: Hepatitis C 19:71-78. Además, los kits para la realización de ensayos de bADN básicos (kits de QuantiGene®, que comprenden instrucciones y reactivos tales como multímeros de amplificación, sondas marcadoras marcadas con fosfatasa alcalina, sustrato quimiolumigénico, sondas de captura inmovilizadas sobre un soporte sólido, y similares ) comercialmente disponibles de, p. ej., Panomics, Inc. (en la página de internet ( www. ) ) Panomics.com). El software para el diseño de los grupos de sondas para un ARNm diana dado (p. ej., para el diseño de las regiones de CE, LE, y opcionalmente de BP que son complementarias a la diana) también está comercialmente disponible ( p. ej., ProbeDesigner®) de Panomics, Inc., véase también Bushnell et al (1999) "ProbeDesigner: for the design of probe sets for branched ADN (bADN) signal amplification assays Bioinformatics 15:348-55 ). El ensayo de bADN básico, sin embargo, permite la detección de una sola diana de ácido nucleico por ensayo, mientras que, como se ha descrito anteriormente, con frecuencia es deseable la detección de múltiples ácidos nucleicos.

Entre otros aspectos, la presente invención proporciona ensayos de ADNb multiplex que se pueden utilizar para la detección simultánea de dos o más ácidos nucleicos diana. Del mismo modo, un aspecto de la presente invención proporciona ensayos ADNb, sencillos o multiplex, que tienen el ruido de fondo debido a sucesos de hibridación no específica reducido.

En general, en los ensayos de la invención, se utilizan dos o más extensores marcadores para capturar un único componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., un preamplificador o multímero de amplificación). La temperatura de ensayo y la estabilidad del complejo entre un único LE y el componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., el preamplificador o multímero de amplificación) se pueden controlar de tal manera que la unión de un único LE al componente no sea suficiente para asociar de manera estable el componente con un ácido nucleico al que está unido el LE, mientras que la unión simultánea de dos o más LE con el componente puede asociarlo con el ácido nucleico. El requerimiento de tal hibridación cooperativa de múltiples LE para que el sistema de sonda marcadora capture el ácido nucleico de interés tiene como resultado una alta especificidad y una baja hibridación cruzada de fondo del LE con otros ácidos nucleicos no diana.

Para que un ensayo consiga una alta especificidad y sensibilidad, tiene que tener preferentemente un ruido de fondo bajo, resultado de, p. ej., una de hibridación cruzada mínima. Este ruido de fondo bajo y la hibridación cruzada mínima son generalmente bastante más difíciles de lograr en un ensayo múltiple que un ensayo sencillo, debido a que el número de posibles interacciones no específicas se incrementan en gran medida en un ensayo múltiple debido al aumento del número de sondas utilizadas en la ensayo (p. ej., el mayor número de CE y LE). El requerimiento de múltiples interacciones simultáneas entre LE y los componentes del sistema de sonda marcadora para que el sistema de sonda marcadora capture un ácido nucleico diana minimiza la posibilidad de que se produzca la captura no específica, aun cuando por ejemplo se produzcan algunas interacciones no específicas CE- LE o LE - CP. Esta reducción del ruido de fondo por medio de la minimización de los eventos de hibridación cruzada no deseables facilita por consiguiente la detección múltiple de los ácidos nucleicos de interés.

Los métodos de la invención se pueden utilizar, p. ej., para la detección múltiple de dos o más ácidos nucleicos de forma simultánea, incluso a partir de muestras complejas, sin necesidad de purificación previa de los ácidos nucleicos. En un aspecto, estos métodos implican la captura de los ácidos nucleicos por partículas (p. ej., subgrupos distinguibles de microesferas), mientras que en otro aspecto, los ácidos nucleicos se capturan en un soporte sólido espacialmente direccionable. También se describen composiciones, kits y sistemas relacionados con estos métodos.

## 55 Métodos

Como se ha indicado, un aspecto de la invención proporciona ensayos de ácidos nucleicos multiplex. Por lo tanto, una clase general de realizaciones incluye métodos de detección de dos o más ácidos nucleicos de interés. En estos métodos, una muestra que comprende o se sospecha de que comprende los ácidos nucleicos de interés, se proporcionan dos o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora. Cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos

nucleicos de interés. El sistema de sonda marcadora comprende un marcador, y un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores en un subgrupo.

5 Los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra se capturan en un soporte sólido. Cada ácido nucleico de interés capturado en el soporte sólido se hibrida con su correspondiente subgrupo de  $m$  extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se hibrida con los  $m$  extensores marcadores. A continuación, se detecta la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido. Dado que el marcador está asociado con el ácido nucleico de interés por medio de la hibridación de los extensores marcadores y el sistema de sonda marcadora, se establece una correlación entre la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido y la presencia o ausencia del ácido nucleico de interés en el soporte sólido y por lo tanto en la muestra original.

10 Básicamente, cualquier soporte sólido adecuado se puede utilizar en estos métodos. Por ejemplo, el soporte sólido puede comprender partículas tales como microesferas, o puede comprender un soporte prácticamente plano y/o espacialmente direccionable. Se capturan distintos ácidos nucleicos de manera opcional en diferentes subgrupos distinguibles de partículas o en diferentes posiciones en un soporte sólido espacialmente direccionable. Los ácidos nucleicos de interés pueden ser capturados por soporte sólido mediante cualquiera de una variedad de técnicas, p. ej., mediante la unión directamente al soporte sólido o mediante la unión a un resto unido al soporte, o por medio de la hibridación con otro ácido nucleico unido al soporte sólido. Preferiblemente, los ácidos nucleicos son capturados por el soporte sólido por medio de la hibridación con extensores de captura y sondas de captura.

15 En una clase de realizaciones, se proporciona una población combinada de las partículas que constituyen el soporte sólido. La población se compone de dos o más subgrupos de partículas, y una pluralidad de partículas de cada subgrupo se distingue de una pluralidad de partículas de cada uno de los otros subgrupos. Las partículas en cada subgrupo se han asociado con un tipo sonda de captura diferente. (Generalmente, prácticamente todas las partículas de cada subgrupo son distinguibles de prácticamente todas de las partículas de cada otro subgrupo.) Las partículas de cada subgrupo están asociadas con una sonda de captura diferente.

20 También se proporcionan dos o más subgrupos de  $n$  extensores de captura, en donde  $n$  es por lo menos dos. Cada subgrupo de  $n$  extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de  $n$  extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presente en la muestra se hibrida con el correspondiente subgrupo de  $n$  extensores de captura y el subgrupo de  $n$  extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando así el ácido nucleico en el subgrupo de partículas con el que los extensores de captura están asociados.

25 Por lo general, en esta clase de realizaciones, se identifican por lo menos una parte de las partículas de cada subgrupo y se detecta la presencia o ausencia de marcador en esas partículas. Dado que existe una correlación entre un subgrupo específico de partículas y un ácido nucleico de interés particular, los subgrupos de partículas que tienen el marcador presente indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

30 Básicamente, se puede utilizar cualquier partícula adecuada, p. ej., partículas con características distinguibles que se pueden unir a las sondas de captura. Por ejemplo, en una clase preferida de formas de realización, las partículas son microesferas. Las microesferas de cada subgrupo se pueden de las de otros subgrupos, p. ej., sobre la base de su espectro de emisión fluorescente, su diámetro, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, las microesferas de cada subgrupo pueden estar ser marcadas con un colorante fluorescente único o con una mezcla de colorantes, puntos cuánticos con espectros de emisión distinguibles, y/o similares. A modo de otro ejemplo, las partículas de cada subgrupo se pueden identificar con un código de barras óptico, único para ese subgrupo, presente en las partículas.

35 Las partículas tienen opcionalmente características deseables adicionales. Por ejemplo, las partículas pueden ser magnéticas o paramagnéticas, proporcionando medios convenientes para la separación de las partículas de la solución, p. ej., para simplificar la separación de las partículas a partir de cualquier material no unido a las partículas.

40 En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se capturan en diferentes posiciones sobre un soporte no particulado, sólido espacialmente direccionable. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, el soporte sólido comprende dos o más sondas de captura, en donde cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Se proporcionan dos o más subgrupos de  $n$  extensores de captura, en donde  $n$  es por lo menos dos. Cada subgrupo de  $n$  extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de  $n$  extensores de captura con una posición seleccionada en el soporte sólido. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra se hibrida con su correspondiente subgrupo de  $n$  extensores de captura y el subgrupo de  $n$  extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando así el ácido nucleico en el soporte sólido en la posición seleccionada con la que los extensores de captura están asociados.

Por lo general, en esta clase de realizaciones, se detecta la presencia o ausencia del marcador en las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido. Dado que existe una correlación entre una posición concreta en el soporte y un ácido nucleico de interés concreto, las posiciones que tiene un marcador presente indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

5 El soporte sólido generalmente tiene una superficie plana y es generalmente rígido, pero básicamente cualquier soporte sólido espacialmente direccionable se puede adaptar a la práctica de la presente invención. Los materiales ejemplo de soporte sólido incluyen, pero no se limitan a, vidrio, silicio, sílice, cuarzo, plástico, poliestireno, nylon y nitrocelulosa. A modo de ejemplo, se puede formar una matriz de sondas de captura en posiciones seleccionadas sobre un portaobjetos de vidrio como soporte sólido.

10 En cualquiera de las realizaciones descritas en este documento en donde se utilizan extensores de captura para capturar los ácidos nucleicos en un soporte sólido, n, el número de extensores de captura de un subgrupo, es por lo menos uno, preferiblemente por lo menos dos, y más preferiblemente por lo menos tres. N puede ser por lo menos cuatro o por lo menos cinco o más. Normalmente, pero no necesariamente, n es a lo sumo diez. Por ejemplo, n puede ser de tres y diez, p. ej., de cinco y diez o de cinco y siete, ambos inclusive. El uso de un menor número de  
15 extensores de captura puede ser ventajoso, por ejemplo, en las realizaciones en las que los ácidos nucleicos de interés son se van a detectar específicamente a partir de muestras que incluyen otros ácidos nucleicos con secuencias muy similares a la de los ácidos nucleicos de interés. En otras formas de realización (p. ej., formas de realización en las que se desea la captura de la mayor cantidad de ácido nucleico como sea posible), sin embargo, n puede ser mayor de 10, p. ej., de 20 y 50. N puede ser el mismo para todos los subgrupos de extensores de captura,  
20 pero no necesariamente, p. ej., un subgrupo puede incluir tres extensores de captura, mientras que otro subgrupo incluye cinco extensores de captura. Los n extensores de captura de un subgrupo hibridan preferiblemente con secuencias de polinucleótidos que no se solapan en el ácido nucleico de interés correspondiente. Las secuencias de polinucleótidos que no se solapan pueden ser, pero no necesariamente, consecutivas dentro del ácido nucleico de interés.

25 Cada extensor de captura es capaz de hibridarse con la sonda de captura correspondiente. El extensor de captura incluye generalmente una secuencia de polinucleótidos C-1 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos C-2 en su correspondiente sonda de captura. La captura de los ácidos nucleicos de interés por medio de la hibridación con los extensores de captura y con las sondas de captura implica opcionalmente la hibridación cooperativa. En un aspecto, los extensores de captura y las sondas de captura están configurados como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 60/680.976 presentada el 12 de mayo de 2005 por Luo et al., de título "Multiplex  
30 branched-chain DNA assays."

La sonda de captura puede incluir la secuencia de polinucleótidos además de C-2 o C-2 puede comprender la secuencia de polinucleótidos completa de la sonda de captura. Por ejemplo, cada sonda de captura incluye opcionalmente una secuencia de enlace entre el sitio de unión de la sonda de captura a las partículas y la secuencia  
35 C-2 (p. ej., una secuencia de enlace que contiene 8 T, a modo de un ejemplo posible).

Estos métodos son útiles para la detección múltiple de ácidos nucleicos, opcionalmente detección altamente multiplexada. Por lo tanto, los dos o más ácidos nucleicos de interés (p. ej., los ácidos nucleicos que van a ser detectados) opcionalmente comprenden cinco o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o incluso  
40 100 o más ácidos nucleicos de interés, mientras que los dos o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden cinco o más, 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, o incluso 100 o más subgrupos de m extensores marcadores. En realizaciones en las que se utilizan extensores de captura, soportes sólidos en partículas, y/o soportes sólidos espacialmente direccionables, se proporcionan un número similar de subgrupos de extensores de captura, subgrupos de partículas, y/o posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido.

45 El sistema de sonda marcadora incluye opcionalmente un multímero de amplificación y una pluralidad de sondas marcadoras, donde el multímero de amplificación es capaz de hibridarse con los extensores marcadores y a una pluralidad de sondas marcadoras. En otro aspecto, el sistema de sonda marcadora incluye un preamplificador, una pluralidad de multímeros de amplificación, y una pluralidad de sondas marcadoras, en donde el preamplificador se hibrida con los extensores marcadores, y los multímeros de amplificación hibridan con el preamplificador y a la pluralidad de sondas marcadoras. A modo de otro ejemplo, el sistema de sonda marcadora puede incluir sólo las  
50 sondas marcadoras, que hibridan directamente con los extensores marcadores. En una clase de realizaciones, la sonda marcadora comprende el marcador, p. ej., un marcador unido covalentemente. En otras formas de realización, la sonda marcadora se configura para que se una a un marcador, p. ej., una sonda marcadora de biotina puede unirse a un marcador asociado de estreptavidina.

55 El marcador puede ser básicamente cualquier marcador conveniente que directa o indirectamente proporcione una señal detectable. En un aspecto, el marcador es un marcador fluorescente (p. ej., un fluoróforo o punto cuántico). La detección de la presencia del marcador en las partículas consiste por lo tanto en la detección de una señal fluorescente del marcador. En realizaciones en las que el soporte sólido comprende partículas, la emisión fluorescente del marcador es generalmente distinguible de cualquier emisión fluorescente de las partículas, p. ej., microesferas, y son posibles muchas combinaciones adecuadas de microesferas fluorescentes-marcadores

fluorescentes. Como otros ejemplos, el marcador puede ser un marcador luminiscente, un marcador de dispersión de luz (p. ej., partículas de oro coloidal), o una enzima (p. ej., HRP).

Como se señaló anteriormente, un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores de un subgrupo. Generalmente, el componente del sistema de sonda marcadora que se hibrida con los dos o más extensores marcadores es un multímero de amplificación o preamplificador. Preferiblemente, la unión de un único extensor marcador al componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., el multímero de amplificación o preamplificador) es insuficiente para capturar el sistema de sonda marcadora del ácido nucleico de interés al que se une el extensor marcador. Por lo tanto, en un aspecto, el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación o preamplificador, siendo el multímero de amplificación o preamplificador capaz de hibridarse con los por lo menos dos extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se hibrida (o sus componentes) se hibrida con los  $m$  extensores marcadores a una temperatura de hibridación, siendo la temperatura de hibridación mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo formado por cada extensor marcador individual y el multímero de amplificación o preamplificador. La temperatura de hibridación es generalmente alrededor de  $5^\circ\text{C}$  o superior que la  $T_m$ , p. ej., aproximadamente  $7^\circ\text{C}$  o superior, aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  o superior, aproximadamente  $12^\circ\text{C}$  o superior, aproximadamente  $15^\circ\text{C}$  o superior, aproximadamente  $17^\circ\text{C}$  o superior, o incluso aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  o superior que la  $T_m$ . Vale la pena señalar que la temperatura de hibridación puede ser la misma o diferente que la temperatura a la que los extensores marcadores y los extensores de captura opcionales hibridan con los ácidos nucleicos de interés.

Cada extensor marcador generalmente incluye una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria de una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria de una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., el preamplificador o multímero de amplificación). Es evidente que la cantidad de solapamiento entre cada extensor marcador individual y el componente del sistema de sonda marcadora (es decir, la longitud de L-2 y M-1) afecta a la  $T_m$  del complejo formado por el extensor marcador y el componente, como lo hace, p. ej., la cantidad de bases GC de las secuencias de L-2 y M-1. Opcionalmente, todos los extensores marcadores tienen la misma longitud de secuencia de L-2 y/o idénticas secuencias de polinucleótidos L-2. Alternativamente, los distintos extensores marcadores pueden tener diferente longitud y/o secuencia de polinucleótidos en las secuencias L-2. También es evidente que el número de extensores marcadores necesarios para que el componente captura de manera estable el ácido nucleico de interés depende, en parte, de la cantidad de solapamiento entre los extensores marcadores y el componente (es decir, la longitud de L-2 y M-1).

Se puede lograr la captura estable del componente del sistema de la sonda marcadora por medio de por lo menos dos extensores marcadores, p. ej., reduciendo al mínimo la captura de los ácidos nucleicos extraños, por ejemplo, equilibrando el número de extensores marcadores que se unen al componente, la cantidad de solapamiento entre los extensores marcadores y el componente la longitud de L-2 y M-1), y/o la astringencia de las condiciones bajo las cuales hibridan los extensores marcadores y el componente.

Se puede determinar experimentalmente, por ejemplo por un experto en la técnica, la combinación adecuada de la cantidad de complementariedad entre los extensores marcadores y el componente del sistema de la sonda marcadora, el número de extensores marcadores que se unen al componente, y la astringencia de la hibridación. Por ejemplo, se puede elegir un número determinado de extensores marcadores y unas condiciones de hibridación determinadas, mientras que el número de nucleótidos que son complementarios con los extensores marcadores y el componente va variando hasta que la hibridación de los extensores marcadores con un ácido nucleico captura el componente con el ácido nucleico mientras que la hibridación de un único extensor marcador no capta de manera eficiente el componente. La astringencia se puede controlar, por ejemplo, por medio del control de la concentración de formamida, de la concentración de sal caotrópica, de la concentración de sal, del pH, del contenido de disolvente orgánico, y/o de la temperatura de hibridación.

Como se ha señalado, la  $T_m$  de cualquier ácido nucleico de doble cadena se puede medir directamente, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede obtener una curva de desnaturalización térmica para el doble cadena, el punto medio de la cual corresponde a la  $T_m$ . Es obvio que tales curvas de desnaturalización se pueden conseguir en condiciones que tengan básicamente cualquier pH, concentración de sal, contenido de disolvente, y/o similares, relevante.

La  $T_m$  de una doble cadena en particular (p. ej., una  $T_m$  aproximada) también se puede calcular. Por ejemplo se puede calcular la  $T_m$  de una doble cadena oligonucleótido-diana utilizando el siguiente algoritmo, que incorpora los parámetros termodinámicos contiguos más cercanos:  $T_m$  (Kelvin) =  $\Delta H^\circ / (\Delta S^\circ + R \ln C_i)$ , donde los cambios en la entalpía estándar ( $\Delta H^\circ$ ) y la entropía ( $\Delta S^\circ$ ) se calcularon a partir de los parámetros termodinámicos contiguos más cercanos (ver, p. ej., SantaLucia (1998) "A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1460-1465, Sugimoto et al. (1996) "Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes" Nucleic Acids Research 24: 4501-4505, Sugimoto et al. (1995) "Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes" Biochemistry 34:11211-11216, y et al. (1998) "Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model

for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs" *Biochemistry* 37: 14719-14735),  $R$  es la constante de los gases ideales ( $1.987 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) y  $C_t$  es la concentración molar del oligonucleótido. La  $T_m$  calculada se corrige de manera opcional para la concentración de sal, p. ej., para la concentración de  $\text{Na}^+$ , utilizando la fórmula  $1/T_m(\text{Na}^+) = 1/T_m(1M) + (4.29f(\text{G C}) - 3.95) \times 10^{-5} \ln[\text{Na}^+] + 9.40 \times 10^{-6} \ln^2[\text{Na}^+]$ . Para más detalles véase, p. ej. 5 Owczarzy et al. (2004) "Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures" *Biochemistry* 43:3537-3555. En Internet se encuentra disponible una calculadora en la página [scitools.idtdna.com/analyzer/oligocalc.asp](http://scitools.idtdna.com/analyzer/oligocalc.asp) para estimar  $T_m$  utilizando los algoritmos anteriores. En el estado de la técnica se conocen otros algoritmos para calcular  $T_m$  y se aplican opcionalmente en la presente invención.

Generalmente, el componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., el múltiplo de amplificación o preamplificador) es capaz de hibridarse simultáneamente con dos de los  $m$  extensores marcadores de un subgrupo, aunque opcionalmente se hibrida con tres, cuatro, o más extensores marcadores. En una clase de realizaciones, p. ej., en las formas de realización en donde dos (o más) extensores marcadores se unen al componente del sistema de sonda marcadora, la secuencia de L-2 tiene una longitud de 20 nucleótidos o menos. Por ejemplo, L-2 tener una longitud de 9 y 17 nucleótidos, p. ej., de 12 y 15 nucleótidos de longitud, de 13 y 15 nucleótidos de longitud, o de 13 y 14 nucleótidos de longitud. Como se ha señalado,  $m$  es por lo menos dos, y puede ser por lo menos tres, por lo menos cinco, por lo menos 10, o más.  $M$  puede ser igual o diferente de un subgrupo a otro subgrupo de extensores marcadores.

Los extensores marcadores se pueden configurar de varias formas. Por ejemplo, los dos extensores marcadores que hibridan con el componente del sistema de sonda marcadora pueden asumir una disposición cruciforme, con un extensor marcador que tenga L-1 5' de L-2 y el otro extensor marcador que tenga L-1 3' de L-2. Inesperadamente, sin embargo, una configuración en la que el extremo 5' o el extremo 3' de los dos extensores marcadores se hibrida con el ácido nucleico, mientras que el otro extremo se une al componente, produce una unión más fuerte del componente con el ácido nucleico que la de una disposición cruciforme de los extensores marcadores. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, por lo menos los dos extensores marcadores (p. ej., los  $m$  extensores marcadores de un subgrupo) tienen cada uno L-1 5' de L-2 o tiene cada uno L-1 3' de L-2. Por ejemplo, L-1, que se hibrida con el ácido nucleico de interés, puede estar en el extremo 5' de cada extensor marcador, mientras que L-2, que se hibrida con el componente del sistema de sonda marcadora, se encuentra en el extremo 3' de cada extensor marcador (o vice versa). L-1 y L-2 están separados opcionalmente por una secuencia adicional. En una forma de realización ejemplar, L-1 se encuentra en el extremo 5' del extensor marcador y tiene una longitud aproximada de 20-30 nucleótidos de longitud, L-2 se encuentra en el extremo 3' del extensor marcador y tiene una longitud aproximada de 13-14 nucleótidos de longitud, y L-1 y L-2 están separados por un espaciador (p. ej., 5 T).

Un extensor marcador, preamplificador, múltiplo de amplificación, sonda marcadora, sonda de captura y/o extensor de captura comprende opcionalmente por lo menos un nucleótido sintético. Por ejemplo, un extensor marcador y el componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., el múltiplo de amplificación o el preamplificador) comprenden opcionalmente, en posiciones complementarias, por lo menos un par de nucleótidos sintéticos que se complementan entre sí, pero que no se complementan con las bases de Watson - Crick típicas del ADN o ARN biológico (p. ej., A, C, G, T, o U). Ejemplos de nucleótidos sintéticos incluyen, pero no se limitan a, los nucleótidos Locked Nucleic Acid® (de Exiqon A/S, ([www.exiqon.com](http://www.exiqon.com)); véase, p. ej., SantaLucia Jr. (1998) *Proc Natl Acad Sci* 95:1460-1465) e isoG, isoC, y otros nucleótidos utilizados por el sistema AEGIS (Artificially Expanded Genetic Information System, de EraGen Biosciences, ([www.era-gen.com](http://www.era-gen.com)); véanse, p. ej., las patentes EE.UU 6,001,983, EE.UU 6,037,120, and EE.UU 6,140,496). El uso de estos pares de bases sintéticas (p. ej., los pares de bases isoG -isoC) en las sondas puede, p. ej., reducir el ruido de fondo y/o simplificar el diseño de la sonda al disminuir la hibridación cruzada, o puede permitir el uso de sondas más cortas (p. ej., secuencias L-2 y M-1 más cortas) cuando los pares de bases sintéticos tienen mayor afinidad de unión que los pares de bases naturales.

Estos métodos se pueden usar opcionalmente para cuantificar las cantidades de ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, se mide una intensidad procedente del marcador, p. ej., para cada subgrupo de partículas o para la posición seleccionada en el soporte sólido, y se establece una correlación con la cantidad del ácido nucleico de interés correspondiente presente.

Como se ha señalado, las sondas de bloqueo opcionalmente también hibridan con los ácidos nucleicos de interés, lo que puede reducir el ruido de fondo del ensayo. Para un determinado ácido nucleico de interés, los extensores marcadores correspondientes, los extensores de captura opcionales, y las sondas de bloqueo opcionales son complementarios preferiblemente de secuencias físicamente distintas, que no se superponen en el ácido nucleico de interés, que son preferiblemente, pero no necesariamente, contiguas. Las  $T_m$  de los complejos extensor de captura-ácido nucleico, extensor marcador-ácido nucleico, y sonda de bloqueo-ácido nucleico son preferentemente mayores que la temperatura a la que los extensores de captura, los extensores marcadores, y/o las sondas de bloqueo hibridan con el ácido nucleico, p. ej., en  $5^\circ\text{C}$  o  $10^\circ\text{C}$  o, preferiblemente, en  $15^\circ\text{C}$  o más, de tal manera que estos complejos son estables a esta temperatura. Las posibles secuencias CE y LE (p. ej., las posibles secuencias C-3 y L-1) se examinan opcionalmente para detectar posibles interacciones con los ácidos nucleicos de interés no correspondientes, GE o CE, el preamplificador, el múltiplo de amplificación, la sonda de marcaje y/o cualquiera de las secuencias genómicas relevantes, por ejemplo, las secuencias que se espera que hibriden de forma cruzada con los ácidos nucleicos no deseados generalmente no son seleccionadas para su uso en CE o GE. Véase, p. ej., Player



et al. (2001) "Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization" J Histochem Cytochem 49:603-611 y la solicitud de patente EE.UU 60/680,976. El examen puede ser, p. ej., visual (p. ej., el examen visual de la complementariedad), computacional (p. ej., el cálculo y la comparación de las energías libres de unión), y/o experimentales (p. ej., experimentos de hibridación cruzada). Las secuencias de las sondas de captura se examinaron de manera similar preferiblemente, para asegurar que la secuencia del polinucleótido C-1 complementaria a la secuencia de una sonda de captura C-2 concreta, no realice una hibridación cruzada con ninguna de las otras sondas de captura que se van a estar asociadas con otros subgrupos de partículas o con posiciones seleccionadas del soporte.

En cualquiera de las diversas etapas, los materiales no capturados por el soporte sólido se separan opcionalmente del soporte. Por ejemplo, después de que los extensores de captura, los ácidos nucleicos, los extensores marcadores, las sondas de bloqueo, y las sondas de captura unidas al soporte hibridan, el soporte se lava opcionalmente para eliminar los ácidos nucleicos y las sondas no unidas; posteriormente hibridan los extensores marcadores y el multímero de amplificación, el soporte se lava opcionalmente para eliminar el multímero de amplificación no unido, y/o posteriormente las sondas marcadoras hibridan con el multímero de amplificación, el soporte se lava opcionalmente para eliminar la sonda marcadora no unida antes de la detección del marcador.

En las realizaciones en las que se capturan diferentes ácidos nucleicos para diferentes subgrupos de partículas, se aíslan opcionalmente uno o más de los subgrupos de partículas, mediante los cuales se aísla el ácido nucleico de interés asociado. Del mismo modo, los ácidos nucleicos se pueden aislar a partir de posiciones seleccionadas en un soporte sólido espacialmente direccionable. El ácido nucleico aislado, puede opcionalmente ser separado de las partículas y/o sometido a una manipulación adicional, si se desea (p. ej., amplificación por PCR o similar).

Estos métodos se pueden utilizar para detectar la presencia de los ácidos nucleicos de interés básicamente en cualquier tipo de muestra. Por ejemplo, la muestra puede proceder de un animal, un ser humano, una planta, una célula cultivada, un virus, una bacteria, un patógeno, y/o un microorganismo. La muestra incluye, opcionalmente, un lisado celular, un fluido intercelular, un fluido corporal (incluyendo, pero no limitándose a, sangre, suero, saliva, orina, esputo, o líquido cefalorraquídeo), y/o un medio de cultivo acondicionado, y puede proceder opcionalmente de un tejido (p. ej., un homogeneizado de tejido), una biopsia, y/o un tumor. Del mismo modo, los ácidos nucleicos pueden ser básicamente cualquier ácido nucleico deseada (p. ej., ADN, ARN, ARNm, ARNr, ARNm, etc). A modo de ejemplo, los ácidos nucleicos de interés pueden proceder de uno o más animales, de un ser humano, de una planta, de una célula cultivada, de un microorganismo, de un virus, de una bacteria, o de un patógeno.

Como se ha señalado, estos métodos se pueden utilizar para el análisis de la expresión génica. Por consiguiente, en una clase de realizaciones, los dos o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ARNm. Estos métodos también se pueden utilizar para el diagnóstico clínico y/o la detección de microorganismos, p. ej., patógenos. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos incluyen ARN genómicos viral y/o bacteriano y/o ADN (de doble cadena o de cadena sencilla), plásmido u otro ADN extra-genómico, u otros ácidos nucleicos procedentes de microorganismos (patógenos o de otro tipo). Es evidente que los ácidos nucleicos de doble cadena de interés estarán generalmente desnaturalizados antes hibridarse con los extensores de captura, extensores marcadores, y similares.

Un ejemplo de realización se ilustra esquemáticamente en la Figura 2. La sección A ilustra tres subgrupos distinguibles de microesferas 201, 202, y 203, que se han asociado con las sondas de captura 204, 205, y 206, respectivamente. Cada sonda de captura incluye una secuencia C-2 (250), que es diferente de un subgrupo a otro subgrupo de microesferas. Los tres subgrupos de microesferas se mezclan para formar una población combinada 208 (Sección B). Se proporciona un subgrupo de extensores de captura para cada ácido nucleico de interés; el subgrupo 211 para el ácido nucleico 214, el 212 para el ácido nucleico 215 que no está presente, y el subgrupo 213 para el ácido nucleico 216. Cada extensor de captura incluye la secuencias C-1 (251, complementaria a la secuencia de la sonda de captura correspondiente C-2) y C-3 (252, complementaria a una secuencia del ácido nucleico de interés correspondiente). También se proporcionan tres subgrupos de extensores marcadores (221, 222, y 223 para los ácidos nucleicos 214, 215, y 216, respectivamente) y tres subgrupos de sondas de bloqueo (224, 225, y 226 para los ácidos nucleicos 214, 215, y 216, respectivamente). Cada extensor marcador incluye secuencias de L-1 (254, complementaria a una secuencia del ácido nucleico de interés correspondiente) y L-2 (255, complementaria a M-1). Ácidos nucleicos no diana 230 también están presentes en la muestra de ácidos nucleicos.

Los subgrupos de extensores marcadores 221 y 223 hibridan con los ácidos nucleicos 214 y 216, respectivamente. Además, los ácidos nucleicos 214 y 216 se hibridan con los correspondientes subgrupos de extensores de captura (211 y 213, respectivamente), y los extensores de captura hibridan con las sondas de captura correspondientes (204 y 206, respectivamente), capturando los ácidos nucleicos 214 y 216 en las microesferas 201 y 203, respectivamente (Sección C). Los materiales no unidos a las microesferas (p. ej., los extensores de captura 212, los ácidos nucleicos 230, etc.) se separan de las microesferas mediante lavado. Se proporciona el sistema de sonda marcadora 240 incluyendo el preamplificador 245 (que incluye dos secuencias M-1 257), el multímero de amplificación 241 (que incluye las secuencias M-2 258), y la sonda marcadora 242 (que contiene el marcador 243). Cada preamplificador 245 se hibrida con dos extensores marcadores, los multímeros de amplificación 241 hibridan con el preamplificador, y las sondas de marcaje 242 hibridan con los multímeros de amplificación (Sección D). Los materiales no capturados

en las microesferas se eliminan opcionalmente mediante el lavado de las microesferas. Las microesferas de cada subgrupo se identifican, p. ej., por su espectro de emisión fluorescente ( $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ , Sección E), y se detecta la presencia o ausencia del marcador en cada subgrupo de microesferas ( $\lambda_1$ , Sección E). Debido a que cada ácido nucleico de interés está asociado con un subgrupo distinto de microesferas, se establece una correlación entre la presencia del marcador en un subgrupo dado de microesferas y la presencia del ácido nucleico correspondiente en la muestra original.

Como se representa en la Figura 2, todos los extensores marcadores de todos los subgrupos incluyen generalmente una secuencia idéntica L-2. Opcionalmente, sin embargo, diferentes extensores marcadores (p. ej., extensores marcadores de diferentes subgrupos) pueden incluir diferentes secuencias de L-2. También como se muestra en la Figura 2, cada sonda de captura incluye generalmente una única secuencia C-2 y por lo tanto se hibrida con un único extensor de captura. Opcionalmente, sin embargo, una sonda de captura puede incluir dos o más secuencias C-2 e hibridarse con dos o más extensores de captura. Del mismo modo, como se muestra, cada uno de los extensores de captura de un subgrupo concreto incluye generalmente una secuencia idéntica C-1, y por lo tanto sólo se necesita una única sonda de captura para cada subgrupo de partículas, sin embargo, diferentes extensores de captura de un subgrupo incluyen opcionalmente secuencias C-1 diferentes (y por lo tanto hibridan con diferentes secuencias C-2, en una única sonda de captura o en diferentes sondas de captura sobre la superficie del subgrupo de partículas correspondiente).

En la realización representada en la Figura 2, el sistema de sonda marcadora incluye el preamplificador, el multímero de amplificación, y la sonda marcadora. Es evidente que consideraciones similares se aplican a las formas de realización en las que el sistema de sonda marcadora incluye sólo un multímero de amplificación y la sonda marcadora o únicamente una sonda marcadora.

Las diversas etapas de captura e hibridación pueden llevarse a cabo simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden conveniente. Por ejemplo, en las realizaciones en las que se emplean extensores de captura, cada ácido nucleico de interés puede hibridarse simultáneamente con el correspondiente subgrupo de m extensores marcadores y el subgrupo de n extensores de captura correspondiente, y a continuación, los extensores de captura pueden hibridarse con sondas de captura asociadas y con el soporte sólido. Preferiblemente los materiales no capturados en el soporte se separan, p. ej., por lavado del soporte, y entonces el sistema de sonda marcadora se hibrida con los extensores marcadores.

Otro ejemplo de realización se ilustra esquemáticamente en la Figura 3. La Sección A representa el soporte sólido 301 que tiene nueve sondas de captura previstas sobre él en nueve posiciones seleccionadas (p. ej., 334-336). La Sección B representa una sección transversal de soporte sólido 301, con distintas sondas de captura 304, 305, y 306 en diferentes posiciones seleccionadas sobre el soporte (334, 335, y 336, respectivamente). Se proporciona un subgrupo de extensores de captura para cada ácido nucleico de interés. Sólo están representados tres subgrupos; subgrupo 311 para el ácido nucleico 314, subgrupo 312 para el ácido nucleico 315 que no está presente, y el subgrupo 313 para el ácido nucleico 316. Cada extensor de captura incluye las secuencias C-1 (351, complementaria a la secuencia de la sonda de captura correspondiente C-2) y C-3 (352, complementaria a una secuencia del ácido nucleico de interés correspondiente). También se muestran tres subgrupos de extensores marcadores (321, 322, y 323 para los ácidos nucleicos 314, 315, y 316, respectivamente) y tres subgrupos de sondas de bloqueo (324, 325, y 326 para los ácidos nucleicos 314, 315, y 316, respectivamente) (aunque se proporcionarían nueve, uno para cada ácido nucleico de interés). Cada extensor marcador incluye las secuencias de L-1 (354, complementaria de una secuencia del ácido nucleico de interés correspondiente) y L-2 (355, complementaria de M-1). Los ácidos nucleicos no diana 330 están también presentes en la muestra de ácidos nucleicos.

Los subgrupos de extensores marcadores 321 y 323 hibridan con los ácidos nucleicos 314 y 316, respectivamente. Los ácidos nucleicos 314 y 316 hibridan con el subgrupo de extensores de captura correspondiente (311 y 313, respectivamente), y los extensores de captura hibridan con las sondas de captura correspondientes (304 y 306, respectivamente), capturando los ácidos nucleicos 314 y 316 en las posiciones seleccionadas 334 y 336, respectivamente (Sección C). Los materiales no unidos al soporte sólido (p. ej., los extensores de captura 312, los ácidos nucleicos 330, etc.) se separan del soporte mediante lavado. Se proporciona el sistema de sonda marcadora 340 incluyendo el preamplificador 345 (que incluye dos secuencias M-1 357), multímero de amplificación 341 (que incluye las secuencias de M - 2 358) y la sonda marcadora 342 (que contiene el marcador 343). Cada preamplificador 345 se hibrida con dos extensores marcadores, los multímeros de amplificación 341 hibridan con el preamplificador, y las sondas marcadoras 342 hibridan con los multímeros de amplificación (Sección D). Los materiales no capturados en el soporte sólido se eliminan opcionalmente mediante el lavado del soporte, y se detecta la presencia o ausencia del marcador en cada posición del soporte sólido. Debido a que cada ácido nucleico de interés está asociado con una posición distinta sobre el soporte, se establece una correlación entre la presencia de la marcador en una posición dada sobre el soporte y la presencia del ácido nucleico correspondiente en la muestra original.

Otra clase general de realizaciones proporciona métodos de detección de uno o más ácidos nucleicos, utilizando la configuración novedosa del extensor marcador que se ha descrito anteriormente. En estos métodos, se proporciona

una muestra que comprende o se sospecha que comprende los ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores, en donde  $m$  es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora. Cada subgrupo de  $m$  extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. El sistema de sonda marcadora comprende un marcador, y un componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., un pre-amplificador o un multímero de amplificación) es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores de un subgrupo. Cada extensor marcador comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora, y por lo menos los dos extensores marcadores (p. ej., los  $m$  extensores marcadores de un subgrupo) que tienen cada uno L-1 5' de L-2 o L-1 3' de L-2.

Los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra son capturados en un soporte sólido. Cada ácido nucleico de interés capturado en el soporte sólido se hibrida con el subgrupo correspondiente de  $m$  extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora (o el componente de la misma) se hibrida con los  $m$  extensores marcadores a una temperatura de hibridación. La temperatura de hibridación es mayor que una temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo formado por cada extensor marcador individual y el componente del sistema de sonda marcadora. A continuación, se detecta la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido. Dado que el marcador está asociado con el ácido nucleico de interés mediante la hibridación de los extensores marcadores y el sistema de sonda marcadora, se establece una relación entre la presencia o ausencia del marcador sobre el soporte sólido y la presencia o ausencia del ácido nucleico de interés en el soporte sólido y por lo tanto en la muestra original.

Generalmente, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, y uno o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores.

Las diversas etapas de captura e hibridación pueden llevarse a cabo simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden conveniente. Por ejemplo, las realizaciones en las que se emplean extensores de captura, cada ácido nucleico de interés puede hibridarse simultáneamente con su subgrupo de  $m$  extensores marcadores correspondiente y el correspondiente subgrupo de  $n$  extensores de captura, y a continuación, los extensores de captura pueden hibridarse con las sondas de captura asociadas al soporte sólido. Preferiblemente los materiales no capturados en el soporte se separaron, por ejemplo, por lavado del soporte, y entonces el sistema de sonda marcadora se hibrida con los extensores marcadores.

En cuanto a los métodos descritos anteriormente, básicamente cualquier soporte sólido adecuado puede ser empleado. Por ejemplo, el soporte sólido puede comprender partículas tales como microesferas, o puede comprender un soporte prácticamente plano y/o espacialmente direccionable. Los diferentes ácidos nucleicos son capturados opcionalmente por diferentes subgrupos de partículas distinguibles o en diferentes posiciones en un soporte sólido espacialmente direccionable. Los ácidos nucleicos de interés pueden ser capturados por el soporte sólido por diversas técnicas, p. ej., por unión directamente al soporte sólido o por unión a un resto unido al soporte, o por medio de la hibridación con otro ácido nucleico unido al soporte sólido. Preferiblemente, los ácidos nucleicos son capturados por el soporte sólido mediante la hibridación con los extensores de captura y las sondas de captura.

En una clase de realizaciones en la que uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés y uno o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores, se proporciona una población combinada de partículas que constituyen el soporte sólido. La población comprende dos o más subgrupos de partículas, y una variedad de partículas de cada subgrupo se distingue de una variedad de partículas de cada otro subgrupo. (Generalmente, prácticamente todas las partículas de un subgrupo son distinguibles de prácticamente todas las partículas de cada otro subgrupo.) Las partículas de cada subgrupo se han asociado con una sonda de captura diferente.

También se proporcionan dos o más subgrupos de  $n$  extensores de captura, en donde  $n$  es por lo menos dos. Cada subgrupo de  $n$  extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de  $n$  extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presente en la muestra se hibrida con el correspondiente subgrupo de  $n$  extensores de captura y el subgrupo de  $n$  extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando así el ácido nucleico en el subgrupo de partículas con el que los extensores de captura están asociados.

Por lo general, en esta clase de realizaciones, se identifican por lo menos una parte de las partículas de cada subgrupo y se detecta la presencia o ausencia de marcador en esas partículas. Dado que existe una correlación entre un subgrupo específico de partículas y un ácido nucleico de interés particular, los subgrupos de partículas que tienen el marcador presente indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

En otras formas de realización en las que uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés y uno o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de  $m$  extensores marcadores, los ácidos nucleicos son capturados en diferentes posiciones en un soporte no particulado, espacialmente direccionable. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, el soporte sólido comprende dos o más

5 sondas de captura, en donde cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Se proporcionan dos o más subgrupos de  $n$  extensores de captura, en donde  $n$  es por lo menos dos. Cada subgrupo de  $n$  extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura, asociando de esta manera cada subgrupo de  $n$  extensores de captura con una posición seleccionada en el soporte sólido. Cada uno de los ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra se hibrida con el subgrupo de  $n$  extensores de captura correspondiente y el subgrupo de  $n$  extensores de captura se hibrida con la sonda de captura correspondiente, capturando así el ácido nucleico en el soporte sólido en la posición seleccionada con la que los extensores de captura están asociados.

10 Por lo general, en esta clase de realizaciones, se detecta la presencia o ausencia del marcador en las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido. Dado que existe una correlación entre una posición concreta en el soporte y un ácido nucleico de interés concreto, las posiciones que tiene un marcador presente indican cuales de los ácidos nucleicos de interés están presentes en la muestra.

15 Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores marcadores, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores ; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

20 En un aspecto, la invención proporciona métodos para la captura de una sonda marcada para un ácido nucleico diana, por medio de la hibridación de la sonda marcada directamente con extensores marcadores hibridados con el ácido nucleico o por medio de la hibridación de la sonda marcada con uno o más ácidos nucleicos que a su vez hibridarseon con los extensores marcadores.

25 Por consiguiente, una clase general de realizaciones proporciona métodos de captura de un marcador para un primer ácido nucleico de interés en un ensayo múltiple en donde se detectan dos o más ácidos nucleicos de interés. En estos métodos se proporciona una muestra que comprende el primer ácido nucleico de interés y que también comprende o se sospecha que comprenda uno o más de los otros ácidos nucleicos de interés. Se proporciona un primer subgrupo de  $m$  extensores marcadores, en donde  $m$  es por lo menos dos, y también un sistema de sonda marcadora que comprende el marcador. El primer subgrupo de  $m$  extensores marcadores es capaz de hibridarse con el primer ácido nucleico de interés, y un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores del primer subgrupo. El primer ácido nucleico de interés se hibrida con el primer subgrupo de  $m$  extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se hibrida con los  $m$  extensores marcadores, capturando así el marcador para el primer ácido nucleico de interés.

30 Básicamente todas las características observadas para las formas de realización anteriores se aplican también a estos métodos, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la configuración de los extensores marcadores, número de extensores marcadores por subgrupo, composición del sistema de sonda marcadora, tipo de marcador, número de ácidos nucleicos de interés, fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos; y/o similares. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, el sistema de sonda marcadora comprende una sonda marcadora, sonda marcadora que comprende el marcador, y sonda marcadora que es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores. En otras formas de realización, el sistema de sonda marcadora incluye la sonda marcadora y un multímero de amplificación que es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores. Del mismo modo, en otras formas de realización, el sistema de sonda marcadora incluye la sonda marcadora, un multímero de amplificación, y un preamplificador que es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores.

35 Otra clase general de realizaciones proporciona métodos de la captura de un marcador de un ácido nucleico de interés. En estos métodos, se proporcionan  $m$  extensores marcadores, en donde  $m$  es por lo menos dos. Los  $m$  extensores marcadores son capaces de hibridarse con el ácido nucleico de interés. También se proporciona un sistema de sonda marcadora que comprende el marcador. Un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los  $m$  extensores marcadores. Cada extensor marcador comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria de una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria de una secuencia de polinucleótidos en el componente del sistema de sonda marcadora, y los  $m$  extensores marcadores tienen cada uno L-1 5' de L-2 o en el que los  $m$  extensores marcadores tienen cada uno L-1 3' de L-2. El ácido nucleico de interés se hibrida con los  $m$  extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se hibrida con los  $m$  extensores marcadores a una temperatura de hibridación, capturando así al marcador del ácido nucleico de interés. Preferiblemente, la temperatura de hibridación es mayor que una temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo formado por cada extensor marcador individual y el componente del sistema de sonda marcadora.

Básicamente todas las características observadas para las formas de realización anteriores se aplican también a estos métodos, así ,como relevante, por ejemplo, con respecto a la configuración de los extensores marcadores, el número de extensores marcadores por subgrupo, la composición del sistema de sonda marcadora, el tipo de marcador, y/o similares. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, el sistema de sonda marcadora comprende una sonda marcadora que comprende el marcador, y sonda marcadora que es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores. En otras formas de realización, el sistema de sonda marcadora incluye la sonda marcadora, un multímero de amplificación, y un preamplificador que es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores. Del mismo modo, todavía en otras formas de realización, el sistema de sonda marcadora incluye la sonda marcadora, un multímero de amplificación, y un preamplificador que es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores.

#### Composiciones

Las composiciones relacionadas con estos métodos son otra característica de la presente solicitud. Por lo tanto, una clase general de realizaciones proporciona una composición para la detección de dos o más ácidos nucleicos de interés. En un aspecto, la composición incluye una población combinada de partículas. La población se compone de dos o más subgrupos de partículas, con una pluralidad de partículas en cada subgrupo distinguible de una pluralidad de las partículas de cada uno de los otros subgrupos. Las partículas de cada subgrupo se asocian cada una con una sonda de captura diferente. En otro aspecto, la composición incluye un soporte sólido que comprende dos o más sondas de captura, en donde cada sonda de captura se proporciona en una posición seleccionada sobre el soporte sólido.

La composición también incluye dos o más subgrupos de n extensores de captura, en donde n es por lo menos dos, dos o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador, en donde un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas o con una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Del mismo modo, cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés.

La composición incluye opcionalmente una muestra que comprende o se sospecha que comprende por lo menos uno de los ácidos nucleicos de interés, p. ej., dos o más, tres o más ácidos nucleicos, etc. Opcionalmente, la composición comprende uno o más de los ácidos nucleicos de interés. En una clase de realizaciones, cada ácido nucleico de interés presente en la composición se hibrida con el subgrupo de n extensores de captura correspondiente, y el subgrupo de n extensores de captura correspondiente se hibrida con la sonda de captura correspondiente. Cada ácido nucleico de interés está por lo tanto asociado a un subgrupo de las partículas identificable. En esta clase de realizaciones, cada ácido nucleico de interés presente en la composición también se hibrida con el subgrupo de m extensores marcadores correspondiente. El componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., el multímero de amplificación o preamplificador) se hibrida con los m extensores marcadores. La composición se mantiene a una temperatura de hibridación que es mayor que una temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo formado por cada extensor marcador individual y el componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., el multímero de amplificación o preamplificador) de fusión. La temperatura de hibridación es generalmente alrededor de  $5^\circ\text{C}$  o superior que la  $T_m$ , p. ej., aproximadamente  $7^\circ\text{C}$  o superior, aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  o superior, aproximadamente  $12^\circ\text{C}$  o superior, alrededor de  $15^\circ\text{C}$  o superior, aproximadamente  $17^\circ\text{C}$  o superior, o incluso alrededor de  $20^\circ\text{C}$  o superior que la  $T_m$ .

Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador ; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores ; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

Otra clase general de realizaciones proporciona una composición para la detección de uno o más ácidos nucleicos de interés. La composición incluye un soporte sólido que comprende una o más sondas de captura, uno o más subgrupos de n extensores de captura, en donde n es por lo menos dos, uno o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con el soporte sólido. Cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. Un componente del sistema de sonda marcadora (p. ej. un preamplificador o multímero de amplificación) es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Cada extensor marcador comprende una

secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora, y los m extensores marcadores de un subgrupo tienen cada uno L-1 5' de L-2 o tienen cada uno L-1 3' de L-2.

5 En una clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más grupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende una población combinada de partículas. La población comprende dos o más subgrupos de partículas. Una pluralidad de las partículas de cada subgrupo se distinguen de una pluralidad de las partículas de otro subgrupo, y las partículas de cada subgrupo se asocian con una sonda de captura diferente. Los extensores de captura en cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas.

10 En otra clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende dos o más sondas de captura, en donde cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con una posición seleccionada sobre el soporte sólido.

15 Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

20 Por ejemplo, el sistema de sonda marcadora puede incluir un multímero de amplificación o un preamplificador, donde el multímero de amplificación o el preamplificador son capaces de hibridarse con por lo menos dos extensores marcadores. La composición incluye opcionalmente uno o más ácidos nucleicos de interés, en donde cada ácido nucleico de interés se hibrida con el subgrupo de m extensores marcadores correspondiente y con el subgrupo de n extensores de captura correspondiente, que a su vez se hibrida con la sonda de captura correspondiente. El multímero de amplificación o el preamplificador se hibrida con los m extensores marcadores. La composición se mantiene a una temperatura de hibridación mayor que una temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo formado por un extensor marcador individual y el multímero de amplificación o el preamplificador (p. ej., aproximadamente 5°C o superior, aproximadamente 7°C o superior, aproximadamente 10°C o superior, aproximadamente 12°C o superior, aproximadamente 15°C o superior, aproximadamente 17°C o superior, o aproximadamente 20°C o superior que la  $T_m$ ).

#### Kits

30 La presente solicitud proporciona un kit para la detección de dos o más ácidos nucleicos de interés. En un aspecto, el kit incluye una población combinada de partículas. La población comprende dos o más subgrupos de partículas, con una pluralidad de partículas de cada subgrupo que se distinguen de una pluralidad de partículas de cada otro subgrupo. Las partículas en cada subgrupo están asociadas a una sonda de captura diferente. En otro aspecto, el kit incluye un soporte sólido que comprende dos o más sondas de captura, en el que cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido.

45 El kit también incluye dos o más subgrupos de n extensores de captura, en donde n es por lo menos dos, dos o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador, en el que un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los extensores marcadores m de un subgrupo. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y por lo tanto asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas o con una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Del mismo modo, cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. Los componentes del kit se envasan en uno o más recipientes. El kit también incluye opcionalmente instrucciones para usar el kit para capturar y detectar los ácidos nucleicos de interés, una o más soluciones amortiguadoras (p. ej., amortiguador de lisis, diluyente, amortiguador de hibridación, y/o amortiguador de lavado), estándares que comprenden uno o más ácidos nucleicos a una concentración conocida, y/o similares.

Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de

5 marcador ; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores ; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

10 Otra clase general de realizaciones proporciona un kit para la detección de uno o más ácidos nucleicos de interés. La solicitud describe un kit para la detección de uno o más ácidos nucleicos de interés. El kit incluye un soporte sólido que comprende una o más sondas de captura, uno o más subgrupos de n extensores de captura , donde n es por lo menos dos, uno o más subgrupos de m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, y un sistema de sonda marcadora que comprende un marcador. Cada subgrupo de n extensores de captura es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés, y los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con el soporte sólido. Cada subgrupo de m extensores marcadores es capaz de hibridarse con uno de los ácidos nucleicos de interés. Un componente del sistema de sonda marcadora (p. ej., un preamplificador o multímero de amplificación) es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores de un subgrupo. Cada extensor marcador comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés correspondiente y una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria con una secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora, y por lo menos dos m extensores marcadores (p.ej., los m extensores marcadores de un subgrupo) tienen cada uno L-1 5' de L-2 o tienen cada uno L-1 3' de L-2. Los componentes del kit se envasan en uno o más recipientes. El kit también incluye opcionalmente instrucciones para usar el kit para capturar y detectar los ácidos nucleicos de interés, una o más soluciones amortiguadoras (p. ej., amortiguador de lisis, diluyente, amortiguador de hibridación, y/o amortiguador de lavado), estándares que comprenden uno o más ácidos nucleicos a una concentración conocida, y/o similares.

25 Básicamente todas las características señaladas para los métodos anteriores se aplican también a estas formas de realización, como relevantes; por ejemplo, con respecto a la composición del sistema de sonda marcadora; al tipo de marcador; la inclusión de sondas de bloqueo; la configuración de los extensores de captura, sondas de captura, extensores de la marcaje, y/o sondas de bloqueo; al número de ácidos nucleicos de interés y los subgrupos de partículas o las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido, los extensores de captura y los extensores marcadores; al número de extensores de captura o de marcaje por subgrupo; tipo de partículas; fuente de la muestra y/o de los ácidos nucleicos, y/o similares.

35 Por ejemplo, en una clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más grupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende una población combinada de partículas. La población se compone de dos o más subgrupos de partículas. Una pluralidad de las partículas de cada subgrupo se distinguen de una pluralidad de las partículas de otro subgrupo, y las partículas de cada subgrupo se asocian con una sonda de captura diferente. Los extensores de captura en cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con un subgrupo seleccionado de las partículas.

40 En otra clase de realizaciones, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés, uno o más subgrupos de n extensores de captura comprenden dos o más subgrupos de n extensores de captura, uno o más subgrupos de m extensores marcadores comprenden dos o más subgrupos de m extensores marcadores, y el soporte sólido comprende dos o más sondas de captura, en el que cada sonda de captura se dispone en una posición seleccionada sobre el soporte sólido. Los extensores de captura de cada subgrupo son capaces de hibridarse con una de las sondas de captura y de esta manera asociar cada subgrupo de n extensores de captura con una posición seleccionada sobre el soporte sólido.

#### Sistemas

50 La solicitud describe sistemas, por ejemplo, sistemas usados para poner en práctica los métodos de la presente memoria y/o que comprenden las composiciones descritas en este documento. El sistema puede incluir, p. ej., un fluido y/o elemento de manipulación de microesferas , un fluido y/o elemento que contiene microesferas , un láser para excitar un marcador fluorescente y/o microesferas fluorescentes, un detector para detectar las emisiones de luz de una reacción quimioluminiscente o las emisiones fluorescente procedentes de un marcador fluorescente y/o de microesferas fluorescentes , y/o un elemento robótico que mueve otros componentes del sistema de un lugar a otro según sea necesario (p. ej., un elemento de manejo de placas de múltiples pocillos). Por ejemplo, en una clase de realizaciones, una composición de la invención está contenida en un citómetro de flujo, un instrumento Luminex 100™ o HTS™, un lector de microplacas, un lector de microarrays, un luminómetro, un colorímetro, o instrumentos similares.

El sistema puede incluir opcionalmente un ordenador. El ordenador puede incluir el software apropiado para recibir instrucciones del usuario, ya sea en forma de introducción de datos por el usuario en un grupo de campos de parámetros, p. ej., en GUI, o en forma de instrucciones pre-programadas, p. ej. pre-programadas para una variedad de operaciones específicas diferentes. El software convierte opcionalmente estas instrucciones al lenguaje apropiado para controlar el funcionamiento de los componentes del sistema (p. ej., para el control de un elemento de manejo del fluido, un elemento robótico y/o un láser). El ordenador también puede recibir datos desde otros componentes del sistema, p. ej., de un detector, y puede interpretar los datos, proporcionárselos a un usuario en un formato legible para las personas, o utilizar esos datos para iniciar otras operaciones, de acuerdo con cualquier programación del usuario.

## 10 Marcadores

Una amplia variedad de marcadores son bien conocidos en la técnica y se pueden adaptar a la práctica de la presente invención. Por ejemplo, se han descrito marcadores luminiscentes y marcadores de dispersión de luz (p. ej., partículas de oro coloidal). Véase, p. ej. Csaki et al. (2002) "Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics" *Expert Rev Mol Diagn* 2:187-93.

15 A modo de otro ejemplo, varios marcadores fluorescentes son bien conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitándose a, fluoróforos hidrófobos (p. ej., ficoeritrina, rodamina, Alexa Fluor 488 y fluoresceína), la proteína fluorescente verde (GFP) y variantes de los mismos (p. ej., proteína cian fluorescente y proteína fluorescente amarilla), y los puntos cuánticos. Véase, p. ej., "The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Tenth Edition or Web Edition (2006)" de Invitrogen (disponible en la página de internet ([www.probes.invitrogen.com/handbook](http://www.probes.invitrogen.com/handbook)), para las descripciones de fluoróforos que emiten en varias longitudes de onda diferentes (incluyendo los conjugados en tándem de fluoróforos que pueden facilitar la excitación simultánea y la detección de múltiples especies marcadas). Para el uso de puntos cuánticos como marcadores de las biomoléculas, véase, p. ej. Dubertret et al. (2002) *Science* 298:1759; Nature Biotechnology (2003) 21:41-46; and Nature Biotechnology (2003) 21:47-51.

25 Las marcadores pueden ser introducidos en las moléculas, por ejemplo, en los polinucleótidos, durante la síntesis o por medio de reacciones posteriores a la síntesis mediante tecnologías conocidas en la técnica, por ejemplo, los kits para el marcaje fluorescente de polinucleótidos con diferentes fluoróforos están disponibles en Molecular Probes, Inc. (([www.molecularprobes.com](http://www.molecularprobes.com)), y las fosforamiditas que contienen fluoróforos para utilizar en la síntesis de ácido nucleico están disponibles comercialmente. Del mismo modo, se pueden detectar las señales procedentes de los marcadores (p. ej., por absorción y/o por emisión fluorescente procedente de un marcador fluorescente) básicamente por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la detección multicolor, la detección de FRET, la polarización de la fluorescencia, y similares, son bien conocidos en la técnica.

## 30 Microesferas

35 Las microesferas son las partículas preferidas en ciertas formas de realización descritas en la presente memoria, ya que son generalmente estables, están ampliamente disponibles en una gama de materiales, productos químicos de superficie y tamaños uniformes, y puede ser marcadas con fluorescencia. Las microesferas se pueden distinguir entre sí por medio de características de identificación tales como el tamaño (diámetro) y/o los espectros de emisión fluorescente, por ejemplo.

40 Luminex Corporation ([www.luminexcorp.com](http://www.luminexcorp.com)), por ejemplo, ofrece 100 grupos de microesferas de poliestireno de diámetro uniforme. Las microesferas de cada grupo se marcan internamente con una proporción distinta de dos fluoróforos. Un citómetro de flujo u otro instrumento adecuado se puede por lo tanto utilizar para clasificar cada microesfera individual en función de la proporción de la emisión fluorescente predefinida. Grupos de microesferas codificadas fluorescentemente también están disponibles de muchos otros proveedores, incluidos Radix Biosoluciones (([www.radixbiosolutions.com](http://www.radixbiosolutions.com)) y Upstate Biotechnology (([www.upstatebiotech.com](http://www.upstatebiotech.com)). Alternativamente, BD Biosciences (([www.bd.com](http://www.bd.com)) y Bangs Laboratories, Inc. (([www.bangslabs.com](http://www.bangslabs.com)) ofrecen grupos de microesferas distinguibles por medio de una combinación de fluorescencia y tamaño. A modo de otro ejemplo, se pueden distinguir las microesferas en base de tamaño por sí solo, pero se puede multiplexar un menor número de grupos de estas microesferas en un ensayo ya que los agregados de microesferas más pequeñas pueden ser difíciles de distinguir de las microesferas más grandes.

50 Están disponibles comercialmente microesferas con una variedad de productos químicos de superficie, de los proveedores anteriores y de otros (p. ej., véase los proveedores adicionales que figuran en Kellar and Iannone (2002) "Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays" *Experimental Hematology* 30:1227-1237 and Fitzgerald (2001) "Assays by the score" *The Scientist* 15[11]:25). Por ejemplo, las microesferas con grupos carboxilo, hidrazida o maleimida están disponibles y permiten el acoplamiento covalente de moléculas (p. ej., las sondas de captura de polinucleótidos con aminas libres, carboxilos, aldehídos, sulfhidrilos o otro tipo de grupos reactivos) a las microesferas. A modo de otro ejemplo, están disponibles microesferas con superficie de avidina o estreptavidina y se puede unir a sondas de captura biotiniladas, de manera similar, las microesferas recubiertas con biotina son aptas para unirse a sondas de captura conjugadas con avidina o estreptavidina. Además, están disponibles



comercialmente servicios que acoplan un reactivo de captura elegido por el cliente a microesferas, p. ej., de Radix Biosolutions ((www.) radixbiosolutions.com).

Los protocolos para el uso de las microesferas disponibles (p. ej., los métodos de acoplamiento covalente de polinucleótidos a microesferas carboxiladas para su uso como sondas de captura, los métodos de bloqueo de los sitios reactivos en la superficie de las microesferas que no están ocupados por polinucleótidos, los métodos de unión de polinucleótidos biotinilados a microesferas funcionalizadas con avidina, y similares) se suministran normalmente con las microesferas y son fáciles de utilizar y/o adaptar por un experto. Además, el acoplamiento de reactivos a las microesferas está bien descrito en la literatura. Por ejemplo, véase Yang et al. (2001) "BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a high-throughput diagnostic bioassay" *Genome Res.* 11:1888-98; Fulton et al. (1997) "Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix<sup>TM</sup> system" *Clinical Chemistry* 43:1749-1756; Jones et al. (2002) "Multiplex assay for detection of strain-specific antibodies against the two variable regions of the G protein of respiratory syncytial virus" 9:633-638; Camilla et al. (2001) "Flow cytometric microsphere-based immunoassay: Analysis of secreted cytokines in whole-blood samples from asthmatics" *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:776-784; Martins (2002) "Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplexed seven-analyte viral respiratory antibody profile" *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9:41-45; Kellar and Iannone (2002) "Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays" *Experimental Hematology* 30:1227-1237; Oliver et al. (1998) "Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system" *Clinical Chemistry* 44:2057-2060; Gordon and McDade (1997) "Multiplexed quantification of human IgG, IgA, and IgM with the FlowMetrix<sup>TM</sup> system" *Clinical Chemistry* 43:1799-1801; EE.UU. 5,981,180 entitled "Multiplexed analysis of clinical specimens apparatus and methods" to Chandler et al. (November 9, 1999); EE.UU. 6,449,562 entitled "Multiplexed analysis of clinical specimens apparatus and methods" to Chandler et al. (September 10, 2002); y las referencias que incluyen.

Los métodos de análisis de la población de microesferas (por ejemplo, los métodos de identificación de los subgrupos de microesferas por su tamaño y/o las características de la fluorescencia, los métodos que utilizan el tamaño para distinguir los agregados de microesferas de las microesferas individuales de tamaño uniforme y eliminar los agregados del análisis, los métodos de detección de la presencia o ausencia de un marcador fluorescente en el subgrupo de microesferas, y similares) también están bien descritos en la literatura. Véanse, p. ej., las referencias anteriores.

Están disponibles comercialmente los instrumentos adecuados, el software, y similares para el análisis de poblaciones de microesferas para distinguir los subgrupos de microesferas y detectar la presencia o ausencia de un marcador (p. ej., una sonda marcadora marcada con fluorescencia) en cada subgrupo. Por ejemplo, los citómetros de flujo están ampliamente disponibles, por ejemplo, de Becton-Dickinson ((www.) bd.com) y Beckman Coulter ((www.) beckman.com). Los sistemas Luminex 100<sup>TM</sup> y Luminex HTS<sup>TM</sup> (que utilizan microfluidos para alinear las microesferas y dos rayos láser para excitar las microesferas y el marcador) están disponibles en Luminex Corporation ((www.) luminexcorp.com); el sistema similar "Bio-Plex<sup>TM</sup> Protein Array System" está disponible en Bio-Rad Laboratories, Inc. ((www.) bio-rad.com). Un lector de microplacas confocal adecuado para el análisis de microesferas, FMA<sup>TM</sup> System 8100, está disponible en Applied Biosystems ((www.) appliedbiosystems.com).

A modo de otro ejemplo de partículas que pueden ser adaptadas para su uso en la presente invención, están disponibles grupos de microperlas que incluyen códigos de barras ópticos de CyVera Corporation ((www.) cyvera.com). Los códigos de barras ópticos son códigos digitales inscritos holográficamente que difractan un haz de láser que incide sobre las partículas, produciendo una firma óptica única para cada grupo de microesferas.

#### Técnicas de biología molecular

En la práctica del método de la presente invención, se utilizan opcionalmente muchas técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, y tecnología de ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y están explicadas, por ejemplo, en Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA; Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2000 and *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 2006). Other useful references, e.g. for cell isolation and culture (e.g., for subsequent nucleic acid or protein isolation) include Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York and the references cited therein; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (Eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas and Parks (Eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

#### Preparación de polinucleótidos

En las referencias anteriores se describen los métodos para preparar ácidos nucleicos (p. ej., por amplificación in vitro, purificación a partir de células, o síntesis química), los métodos para la manipulación de ácidos nucleicos (por ejemplo, por digestión con enzimas de restricción, ligadura, etc.) y los diversos vectores, líneas celulares y similares

de uso en la manipulación y preparación de ácidos nucleicos. Además, los métodos de preparación de polinucleótidos ramificados (p. ej., de multímeros de amplificación) se describen en los documentos de patente EE.UU. 5.635.352, EE.UU. 5.124.246, EE.UU. 5.710.264, y EE.UU. 5.849.481, así como en otras referencias mencionadas anteriormente.

- 5 Además, básicamente cualquier polinucleótido (incluyendo, p. ej., los polinucleótidos marcados o biotinilados) puede pedirse en forma personalizada o estándar de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company ((www.) mcr.com), The Great American Gene Company ((www.) genco.com), ExpressGen Inc. ((www.) expressgen.com), Qiagen (oligos.qiagen.com) y otras muchas.

- 10 Un marcador, biotina, u otro resto se pueden introducir opcionalmente en un polinucleótido, ya sea durante o después de la síntesis. Por ejemplo, una biotina fosforamídica se puede incorporar durante la síntesis química de un polinucleótido. Alternativamente, cualquier ácido nucleico puede ser biotinilado utilizando técnicas conocidas en la técnica; los reactivos adecuados están disponibles comercialmente, p. ej., en Pierce Biotechnology ((www.) piercenet.com). Del mismo modo, cualquier ácido nucleico puede estar marcado fluorescentemente, por ejemplo, mediante el uso de kits disponibles comercialmente, tales como los de Molecular Probes, Inc. ((www.) molecularprobes.com) o Pierce Biotechnology ((www.) piercenet.com) o mediante la incorporación de una fosforamídica marcada con fluorescencia durante la síntesis química de un polinucleótido.
- 15

#### Matrices

- 20 En una matriz de sondas de captura sobre un soporte sólido (p. ej., en una membrana, un portaobjetos de vidrio o plástico, un chip de silicio o cuarzo, una placa, u otro soporte sólido espacialmente direccionable), cada sonda de captura generalmente se une (p. ej., electrostáticamente o covalentemente, directamente o por medio de un enlace) al soporte en una ubicación seleccionada único. Los métodos de preparación, uso, y análisis de estas matrices (p. ej., de microarrays) son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Baldi et al. (2002) DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling, Cambridge University Press; Beaucage (2001) "Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications" Curr Med Chem 8:1213-1244; Schena, ed. (2000) Microarray Biochip Technology, pp.19-38, Eaton Publishing; nota técnica "Agilent SurePrint Technology: Content centered microarray design enabling speed and flexibility" disponible en la página de Internet chem.agilent.com/temp/rad01539/00039489.pdf; y las referencias incluidas en las mismas. Las matrices de polinucleótidos previamente sintetizados se pueden formar (p. ej., imprimir), por ejemplo, utilizando instrumentos disponibles comercialmente, tales como un GMS 417 Arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA). Alternativamente, los polinucleótidos pueden ser sintetizados sobre las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido; véase, p. ej., el documento de patente EE.UU. 6.852.490 y EE.UU. 6.306.643, ambos de Genter y Chee titulado "Methods of using an array of pooled probes in genetic analysis."
- 25
- 30

- 35 Los soportes sólidos adecuados están comercialmente disponibles. Por ejemplo, una variedad de membranas (p. ej., de nylon, PVDF, y membranas de nitrocelulosa) están disponibles comercialmente, p. ej., de Sigma-Aldrich, Inc. ((www.) sigmaaldrich.com). A modo de otro ejemplo, los portaobjetos recubiertos previamente y modificados en la superficie con una variedad de productos químicos de superficie están comercialmente disponibles, por ejemplo, en TeleChem Internacional ((www.)arrayit.com), Corning, Inc. (Corning, NY), o Greiner Bio-one, Inc. ((www.) greinerbiooneinc.com). Por ejemplo, los portaobjetos silanizados y sililados con grupos amino y aldehído libres, respectivamente, están disponibles y permiten el acoplamiento covalente de las moléculas (p. ej., los polinucleótidos con aldehído libre, amina, u otros grupos reactivos) a los portaobjetos. A modo de otro ejemplo, los portaobjetos con estreptavidina en la superficie están disponibles y se pueden unir a sondas de captura biotiniladas. Además, están comercialmente disponibles servicios que producen matrices de polinucleótidos a medida del cliente, por ejemplo, en TeleChem Internacional ((www.)arrayit.com) y Agilent Technologies (Palo Alto, CA).
- 40

- 45 Están disponibles comercialmente los instrumentos adecuados, el software y artículos similares para el análisis de matrices para distinguir las posiciones seleccionadas sobre el soporte sólido y para detectar la presencia o ausencia de un marcador (p. ej., una sonda marcadora marcada con fluorescencia) en cada posición. Por ejemplo, los lectores de microarrays están disponibles, p. ej., de Agilent Technologies (Palo Alto, CA), de Affymetrix (Santa Clara, CA), y de Zeptosens (Suiza).

#### Ejemplos

- 50 Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

- A continuación se exponen una serie de experimentos que ilustran diseño de extensores marcadores y que demuestran que una configuración en la que los extremos 5' de los extensores marcadores se hibrida con un ácido nucleico de interés, mientras que los extremos 3' de los extensores marcadores se hibrida con un preamplificador da como resultado una unión más fuerte del preamplificador con el ácido nucleico que la de una disposición cruciforme de los extensores marcadores.
- 55

Dos subgrupos de extensores marcadores fueron diseñados para unirse a un ácido nucleico diana de GAPD humana y a un preamplificador, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 4. Dos extensores marcadores se

unen a cada copia del preamplificador. Como se muestra en el Sección A, en un subgrupo de extensores marcadores, los dos extensores marcadores de cada par se unen al preamplificador a través del mismo extremo (el extremo 5', en este ejemplo) y se unen al ácido nucleico diana a través del otro extremo (configuración doble Z). Como se muestra en el Sección B, en el otro subgrupo de extensores marcadores, los dos extensores marcadores de cada par se unen el preamplificador a través de extremos opuestos: el extremo 5' de un extensor marcador se hibrida con el preamplificador y con el extremo 3' de la diana, mientras el extremo 3' del otro extensor marcador se hibrida con el preamplificador y con el extremo 5' de la diana (configuración cruciforme). La secuencia L-2 (complementario del preamplificador) tiene una longitud de 14 nucleótidos para cada extensor marcador, y las secuencias comparables L-2 y L-1 se utilizaron para los extensores marcadores correspondientes en ambas configuraciones. Las secuencias de los extensores marcadores se presentan en las Tablas 1 y 2. La secuencia del preamplificador es'

5' AGGCATAGGACCCGTGTCT tttttttt AGGCATAGGACCCGTGTCT tttttt  
ATGCTTTGACTCAG AAAACGGTAACTTC 3' (SEQ ID NO:1);

las secuencias subrayadas son complementarias de las secuencias de los extensores marcadores.

15 Tabla 1. Extensores marcadores para la configuración cruciforme. En cada extensor marcador, la secuencia L-2 (complementaria de la secuencia del preamplificador) esta subrayada.

GAPD127	<u>ccagtgactccacgacgtacTTTTgaagttaccgtttt</u>	CP1 Cola	SEQ ID NO:2
GAPD128	<u>ctgagtcгаааgcatTTTTttctcatggtggtgaagacg</u>	CP2 Cabeza	SEQ ID NO:3
GAPD129	<u>tcttgaggctgtgtcactctTTTTgaagttaccgtttt</u>	CP1 Cola	SEQ ID NO:4
GAPD130	<u>ctgagtcгаааgcatTTTTgcaggaggcattgctgatga</u>	CP2 Cabeza	SEQ ID NO:5
GAPD131	<u>cagtagaggcagggatgatgtcTTTTgaagttaccgtttt</u>	CP1 Cola	SEQ ID NO:6
GAPD132	<u>ctgagtcгаааgcatTTTTcacagccttggcagcgc</u>	CP2 Cabeza	SEQ ID NO:7

Tabla 2. Extensores marcadores para la configuración en doble Z. En cada extensor marcador, la secuencia L-2 (complementaria de la secuencia del preamplificador) esta subrayada.

GAPD217	<u>ccagtgactccacgacgtacTTTTgaagttaccgtttt</u>	CP1 Cola	SEQ ID NO:8
GAPD218	<u>ttctcatggtggtgaagacgTTTTctgagtcгаааgcat</u>	CP2 Cola	SEQ ID NO:9
GAPD219	<u>tcttgaggctgtgtcactctTTTTgaagttaccgtttt</u>	CP1 Cola	SEQ ID NO:10
GAPD220	<u>gcaggaggcattgctgatgaTTTTctgagtcгаааgcat</u>	CP2 Cola	SEQ ID NO:11
GAPD221	<u>cagtagaggcagggatgatgtcTTTTgaagttaccgtttt</u>	CP1 Cola	SEQ ID NO:12
GAPD222	<u>cacagccttggcagcgcTTTTctgagtcгаааgcat</u>	CP2 Cola	SEQ ID NO:13

20 Las configuraciones en doble Z y cruciformes de los extensores marcadores fueron evaluadas en un ensayo sencillo de ADNb de QuantiGene™ utilizando básicamente las condiciones estándar de ensayo de QuantiGene™. Los kits de QuantiGene™ están disponibles comercialmente en Panomics, Inc. (en la página de internet (www.) panomics.com). Los ensayos se realizaron básicamente como se describen en las instrucciones del proveedor, con incubación a 53°C en el día uno y 46°C el día dos, 1x grupo de sonda GAPD, 10 amole/pocillo de GAPD transcrito de ARN in vitro, concentración del preamplificador de 100 fmol / pocillo con incubación durante una hora a 46°C, 25 multímero de amplificación (1,0 amp, Bayer) a 100 fmol / pocillo con incubación durante una hora a 46°C, seguido por la sonda marcadora a 100 fmol / pocillo (dilución 1:1000) durante una hora a 46° C, a continuación, sustrato durante 30 minutos a 46°C. En este experimento, la única diferencia entre los dos ensayos es si se utiliza la configuración cruciforme del grupo extensor marcador o la configuración de doble Z del grupo extensor marcador.

30 Los resultados se ilustran en la Figura 4 Sección C, que muestra la luminiscencia menos el ruido de fondo (Unidades de Luz Relativas, señal menos ruido de fondo) medida para la configuración cruciforme y para la configuración doble Z de los extensores marcadores. La señal para el ensayo usando la configuración doble Z de los extensores marcadores (DT LE1-LE2) es casi 2,5 veces mayor que para el ensayo que utiliza la configuración cruciforme de los extensores marcadores (CF LE1-LE2). Para la comparación, los ensayos en los que se incluyó solamente un 35 marcador extensor de cada par en el ensayo dieron señales similares independientemente de si el extensor marcador sencillo que se une al preamplificador procede del subgrupo cruciforme (CF LE1-) o del doble Z (DT LE1-).

La señal más intensa observada utilizando los extensores marcadores de configuración doble Z demuestra que este diseño permite la captura más eficiente del preamplificador que la del diseño cruciforme.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de captura de un marcador de un ácido nucleico de interés, método que comprende:
- a) proporcionar m extensores marcadores, en donde m es por lo menos dos, en donde los m extensores marcadores son capaces de hibridarse con el ácido nucleico de interés;
  - 5 b) proporcionar un sistema de sistema de sonda marcadora que comprende el marcador, en donde un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores, donde cada uno de los por lo menos dos extensores marcadores comprende una secuencia de polinucleótidos L-1 que es complementaria de una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico de interés y comprende una secuencia de polinucleótidos L-2 que es complementaria de una  
10 secuencia de polinucleótidos del componente del sistema de sonda marcadora, y en donde los por lo menos dos extensores marcadores tienen todos L1-5' de L-2 o tienen todos L-1 3' de L-2;
  - c) hibridarse el ácido nucleico de interés con los m extensores marcadores, y
  - d) hibridarse el sistema de sonda marcadora con los m extensores marcadores a una temperatura de hibridación, que es mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo entre cada extensor marcador  
15 individual y el componente del sistema de sonda marcadora, en donde el ácido nucleico de interés se se hibrida con los m extensores marcadores, y el sistema de sonda marcadora se se hibrida con los m extensores marcadores a la citada temperatura de hibridación, capturando de este modo al marcador asociado al ácido nucleico de interés.
2. El método de la reivindicación 1, en donde todos los m extensores marcadores tienen L-1 5' de L-2 o todos tienen L-1 3' de L-2.  
20
3. El método de la reivindicación 1, en donde el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación o preamplificador, donde el citado multímero de amplificación o preamplificador es capaz de hibridarse con por lo menos dos de los m extensores marcadores.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el sistema de sonda marcadora comprende un preamplificador, un multímero de amplificación y una sonda marcadora; en donde el preamplificador es capaz de hibridarse  
25 simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores y con una pluralidad de multímeros de amplificación; en donde el multímero de amplificación es capaz de hibridarse simultáneamente con el preamplificador y con una pluralidad de sondas marcadoras; y donde la sonda marcadora comprende el marcador.
5. El método según la reivindicación 1, en donde el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación y una sonda marcadora; donde el multímero de amplificación es capaz de hibridarse simultáneamente  
30 con por lo menos dos de los m extensores marcadores y con una pluralidad de sondas marcadoras; y donde la sonda marcadora comprende el marcador.
6. El método según la reivindicación 1, en donde el sistema de sonda marcadora comprende una sonda marcadora; donde la sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores; y donde la sonda marcadora comprende el marcador.  
35
7. El método según la reivindicación 1, en donde el componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridarse simultáneamente con por lo menos dos de los m extensores marcadores.
8. El método según la reivindicación 1, en donde la temperatura de hibridación está aproximadamente 5°C por encima o más que la temperatura  $T_m$  de un complejo entre cada extensor marcador individual y el componente del sistema de la sonda marcadora.  
40
9. El método según la reivindicación 1, en donde la temperatura de hibridación está aproximadamente 7° C por encima o más, aproximadamente 10° C por encima o más, aproximadamente 12° C por encima o más, aproximadamente 15° C por encima o más, aproximadamente 17° C por encima o más, aproximadamente 20° C por encima o más que la  $T_m$  de un complejo entre cada extensor marcador individual y el componente del sistema de la sonda marcadora.  
45
10. El método según la reivindicación 1, en donde la secuencia de polinucleótidos L-2 tiene una longitud de 20 nucleótidos o inferior.
11. El método según la reivindicación 10, en donde L-2 tiene una longitud comprendida entre 9 y 17 nucleótidos, o entre 13 y 15 nucleótidos.
- 50 12. El método según la reivindicación 1, en donde cada uno de los por lo menos dos m extensores marcadores mencionados tienen L-1 en el extremo 5' y L-2 en el extremo 3'.

13. El método según la reivindicación 1, en donde cada uno de los por lo menos dos m extensores marcadores mencionados tienen L-1 en el extremo 3' y L-2 en el extremo 5'.
14. El método según la reivindicación 1, que comprende capturar el ácido nucleico de interés sobre un soporte sólido.
- 5 15. El método según la reivindicación 1, que comprende detectar una señal procedente de la sonda.

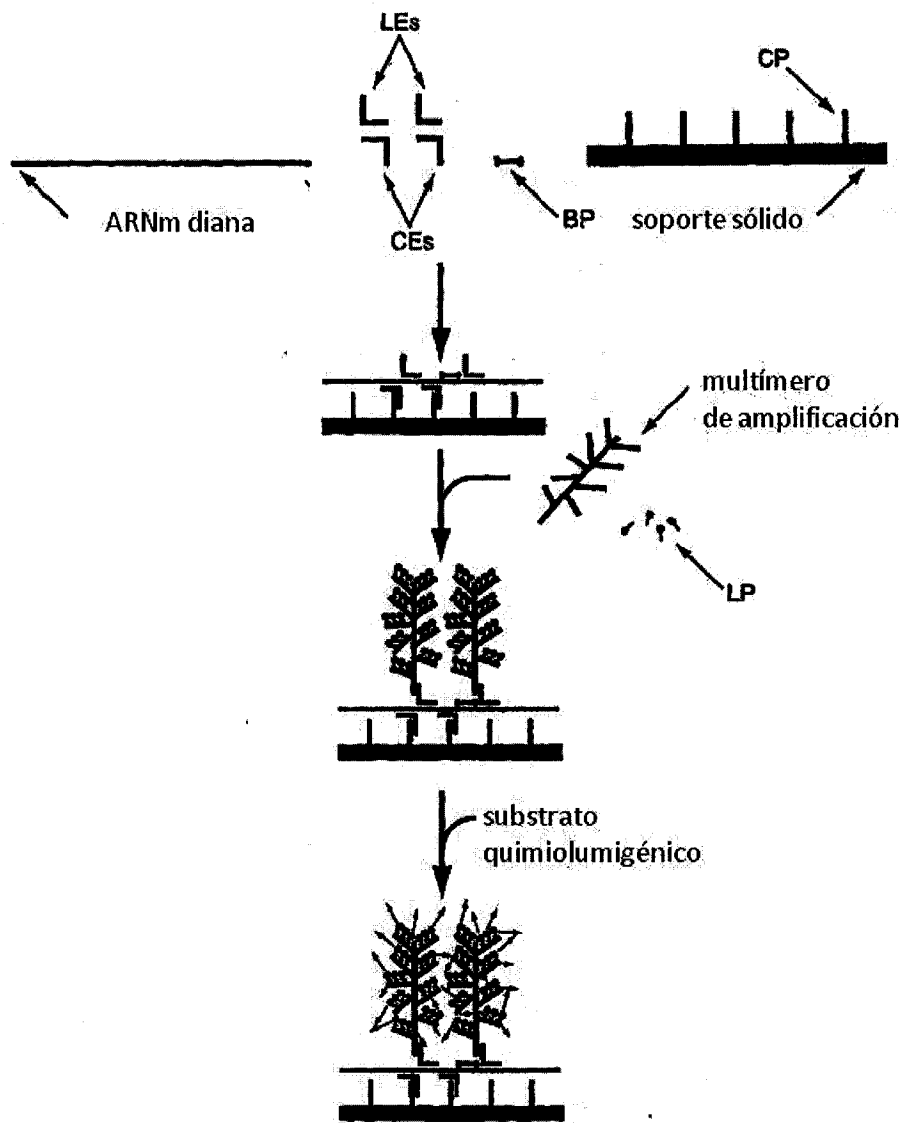


Fig. 1

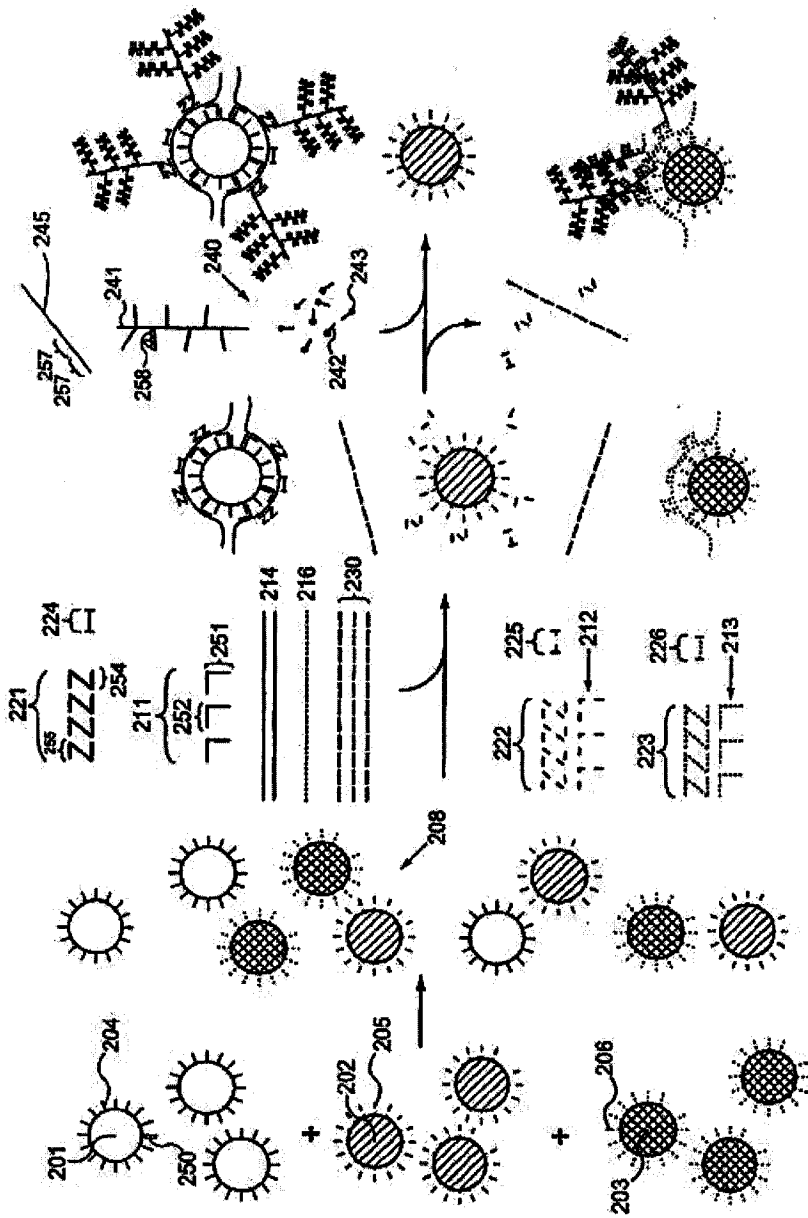


Fig. 2D

Fig. 2C

Fig. 2B

Fig. 2A



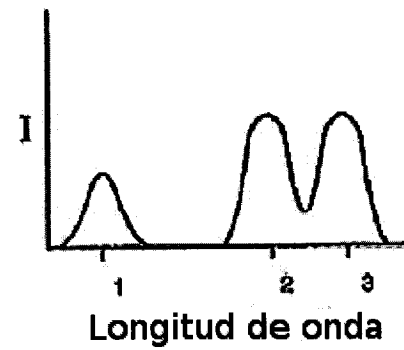
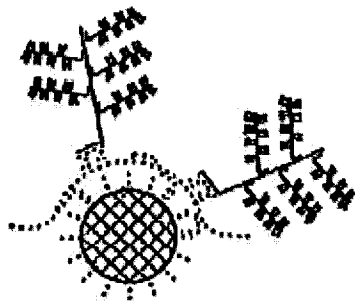
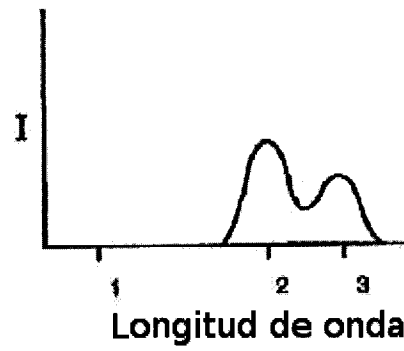
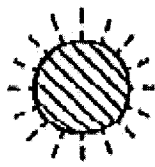
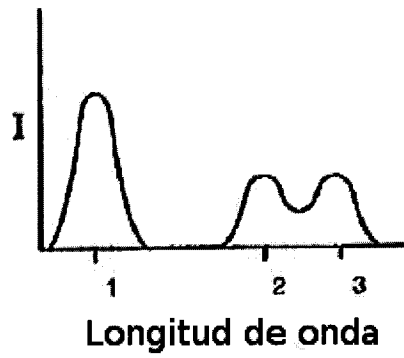
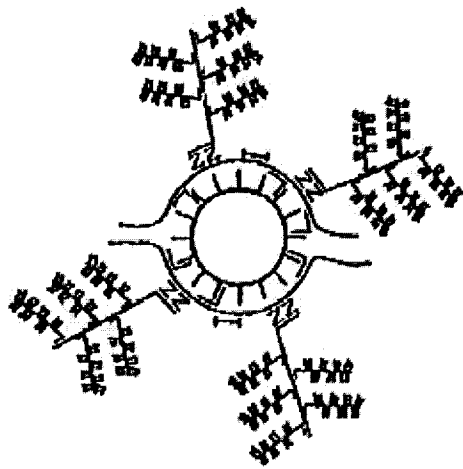


Fig. 2E

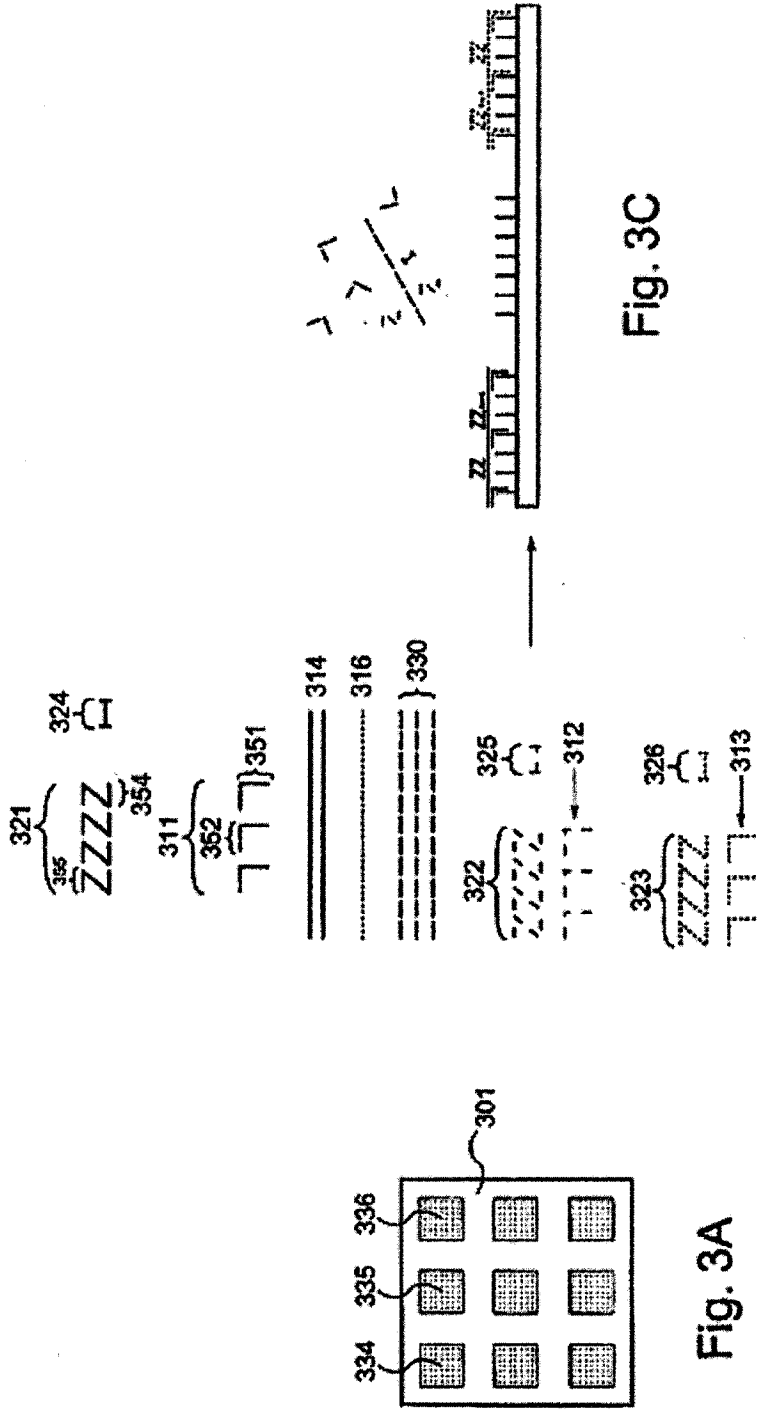


Fig. 3A

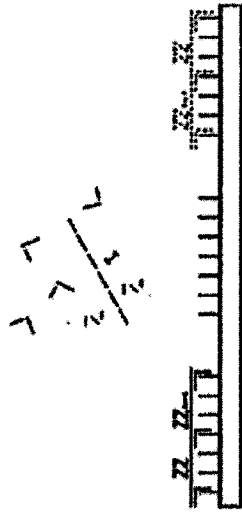


Fig. 3C

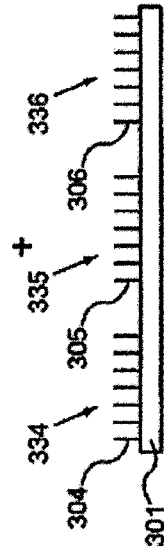


Fig. 3B

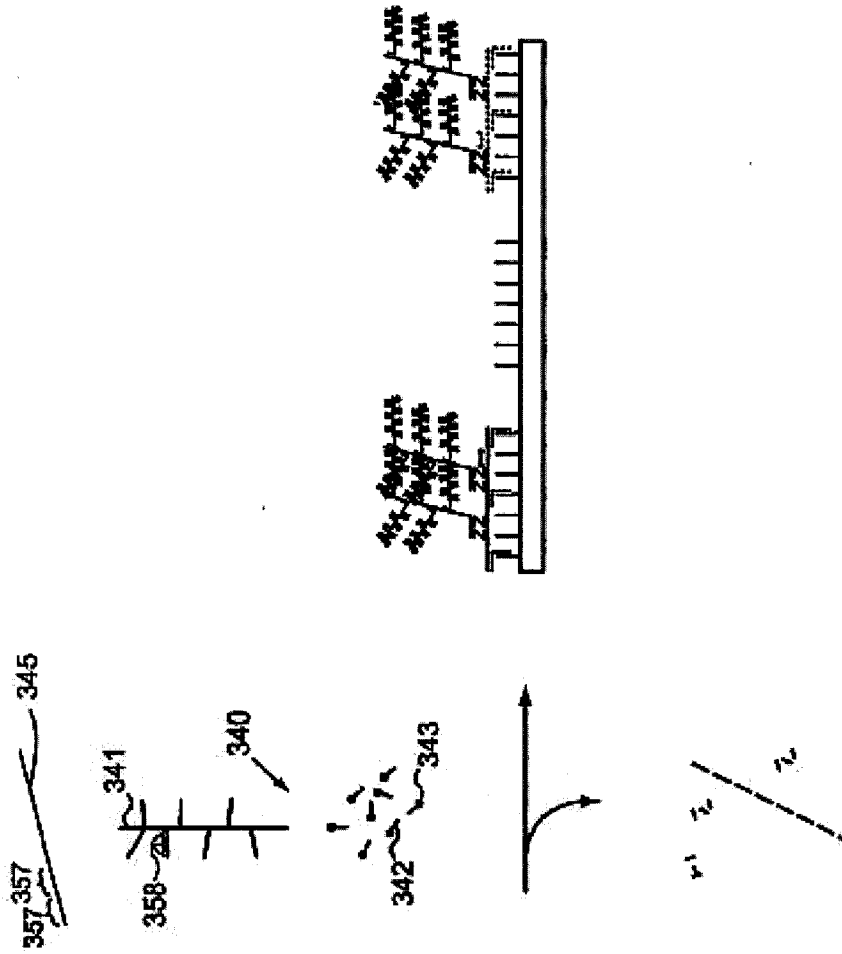


Fig. 3D

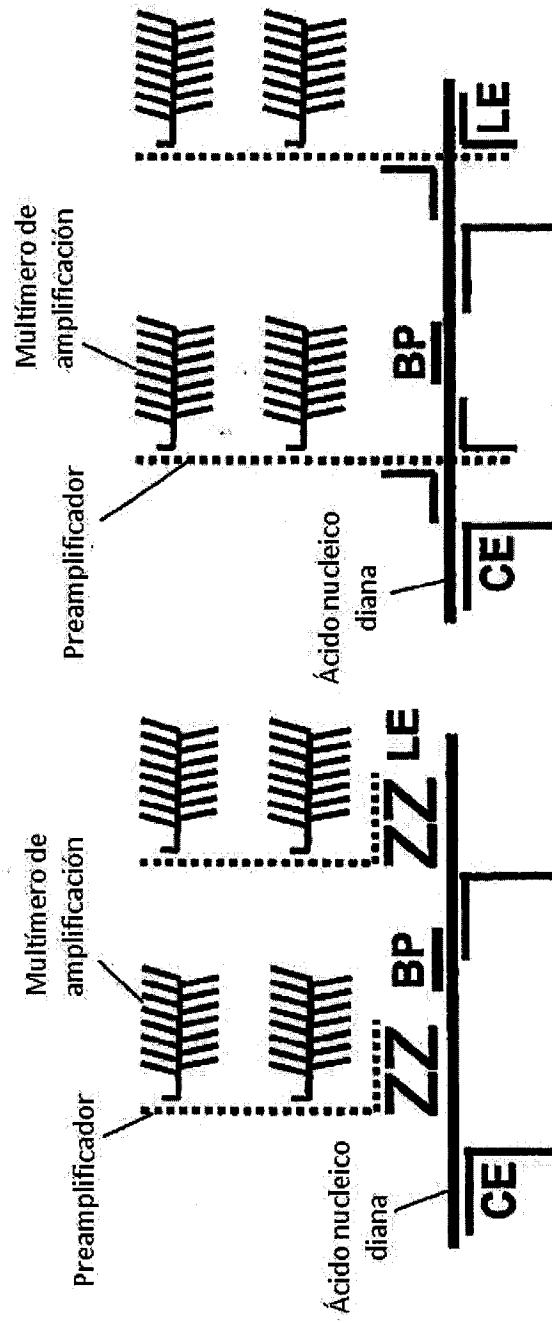


Fig. 4B

Fig. 4A

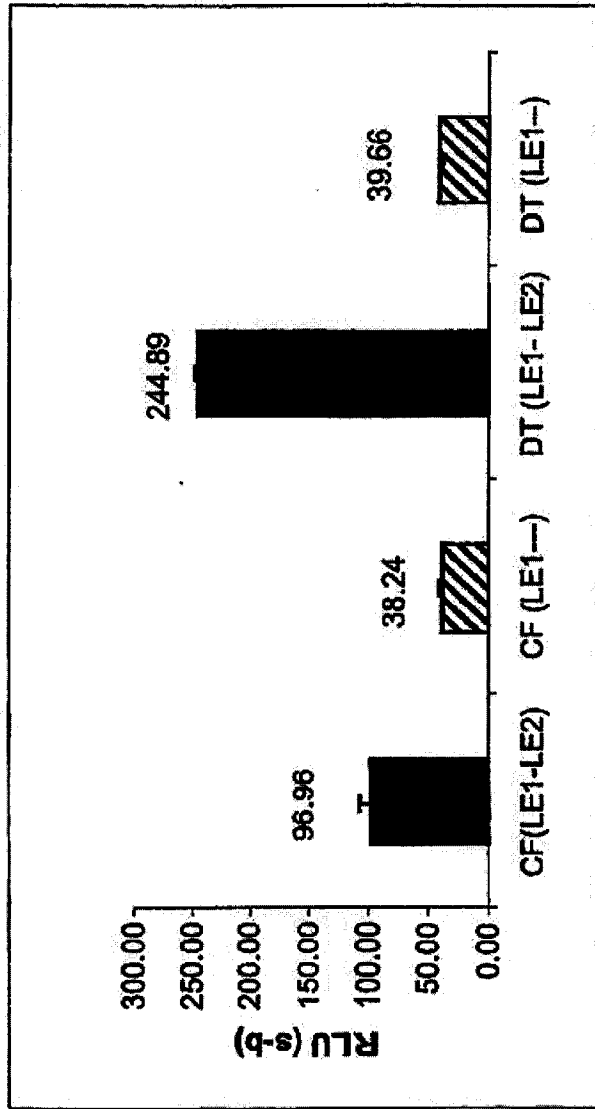


Fig. 4C