(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 565 670**

(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 06785111 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015** **EP 1910572**

(54) Título: **Métodos de detección de ácidos nucleicos en células individuales y de identificación de células raras en grandes poblaciones de células heterogéneas**

(30) Prioridad:

20.06.2005 US 691834 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2016

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

LUO, YULING y
CHEN, SHIPING

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 565 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de detección de ácidos nucleicos en células individuales y de identificación de células raras en grandes poblaciones de células heterogéneas

Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a la química de ácidos nucleicos y a análisis bioquímicos. Más concretamente, la invención se refiere a métodos para la detección in situ de analitos de ácido nucleico en células individuales. La invención también se refiere a la detección y la identificación de células individuales, particularmente células raras.

Antecedentes de la invención

Numerosas pruebas han demostrado que las células cancerosas pueden disociarse del tumor primario y circular en los ganglios linfáticos, la médula ósea, la sangre periférica u otros fluidos corporales. Se ha demostrado que estas células tumorales circulantes (CTC) reflejan las características biológicas de los tumores primarios, incluyendo el potencial para el desarrollo de metástasis y recurrencia del tumor. Por lo tanto, la detección de CTC puede indicar recurrencia de la enfermedad, propagación de células tumorales, y un alto potencial de metástasis a distancia. Todos estos son factores clínicos informativos importantes en la identificación del estado de la enfermedad de los pacientes de cáncer de alto riesgo (p. ej., Vogel et al., 2002; Gilbey et al., 2004; Molnar et al., 2003; Vlems et al, 2003; Ma et al., 2003).

La validación de la utilidad clínica de la detección de CTC como indicador pronóstico no ha progresado tan rápidamente como se esperaba, en gran parte debido a la falta de tecnologías de detección adecuadas. Una dificultad clave en la detección de CTC en sangre periférica u otros fluidos corporales es que las CTC están presentes en la circulación a concentraciones extremadamente bajas, que se estima que se encuentran en el intervalo de una célula tumoral entre 10^6-10^7 glóbulos blancos normales. Como resultado, cualquier tecnología de detección para esta aplicación tiene que exhibir excepcional sensibilidad y especificidad con el fin de limitar la tasa tanto de falsos negativos como de falsos positivos a un nivel aceptable.

Uno de los enfoques existentes incorpora la tecnología de separación inmunomagnética en la detección de CTC intactas (documentos US 6.365.362; US 6.645.731). Utilizando esta tecnología, una muestra de sangre de un paciente de cáncer se incuba con cuentas magnéticas recubiertas con anticuerpos dirigidos contra un antígeno epitelial de superficie como por ejemplo EpCAM (Cristofanilli et al., 2004). Las células marcadas magnéticamente se aíslan a continuación, utilizando un separador magnético. La fracción enriquecida inmunomagnéticamente se procesa adicionalmente para el análisis aguas abajo para la identificación de CTC. Utilizando esta tecnología, se demostró en un estudio prospectivo que el número de CTC después del tratamiento es un indicador independiente de la supervivencia sin progresión y la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama metastásico (Cristofanilli et al., 2004). Aunque esta tecnología ha manifestado alta sensibilidad, su aplicabilidad está limitada por la disponibilidad de anticuerpos de detección que son altamente sensibles y específicos para tipos concretos de CTC. Los anticuerpos pueden presentar unión no específica a otros componentes celulares que puede conducir a baja proporción de señal a ruido y perjudicar la detección posterior. Los anticuerpos que se unen a CTC también se pueden unir a antígenos presentes en otros tipos de células a bajo nivel, dando como resultado un alto nivel de falsos positivos.

Otro enfoque para determinar la presencia de CTC ha sido someter a ensayo la expresión específica en células tumorales del ARN mensajero en la sangre. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real de (QPCR) se ha utilizado para correlacionar la detección de CTC con el pronóstico del paciente. La RT-PCR en tiempo real se ha utilizado para la detección de ARNm de CEA en la sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal (Ito et al., 2002). La supervivencia sin enfermedad de los pacientes con ARNm positivo para CEA en sangre en el postoperatorio fue significativamente menor que en los casos que fueron negativos para ARNm de CEA. Estos resultados sugieren que las células tumorales se vertieron al torrente sanguíneo y dieron lugar a pobres resultados en paciente para pacientes con cáncer colorrectal. Otro informe demostró la utilidad clínica de la detección molecular de CTC en pacientes de melanoma en fase IIBC y IIIAB de AJCC de alto riesgo utilizando marcadores de ARNm múltiples mediante QPCR (Mocellin et al., 2004). La ventaja de la detección de ARNm específico de tumor es que la expresión de cualquier gen específico de tumor se puede utilizar para que sirva como marcador de diagnóstico/pronóstico. Sin embargo, el enfoque QPCR requiere el procedimiento laborioso de aislamiento del ARNm de la muestra de sangre y la transcripción inversa antes de la reacción de PCR. Con frecuencia se observan falsos positivos utilizando esta técnica debido a la contaminación de la muestra por el ADN cromosómico o la expresión de bajo nivel del gen marcador elegido en las células de la sangre normales (Fava et al. 2001). Además, el límite de la sensibilidad de detección de esta técnica es como máximo alrededor de una célula tumoral por 1 ml de sangre, y la tecnología no puede proporcionar un recuento preciso del número de CTC.

Es muy deseable detectar y cuantificar la expresión del ARNm específico de células tumorales a nivel de una sola célula en la sangre u otros fluidos corporales. Una tecnología que puede detectar la expresión de múltiples ARNm específicos en las células individuales en suspensión permitiría tanto la detección sensible y específica como la enumeración de las CTC en la sangre u otros fluidos corporales. Además, esta tecnología podría permitir la recogida

de las células CTC para análisis citológico y molecular aguas abajo. Las técnicas disponibles actualmente no satisfacen estas necesidades.

La tecnología de hibridación in situ (HIS) es un método establecido para localizar y detectar secuencias de ARNm específicas en secciones de tejido o preparaciones celulares morfológicamente conservadas (Hicks et al., 2004). Los especímenes más comunes que se utilizan son las secciones congeladas, las secciones embebidas en parafina o las células en suspensión que fueron sometidas a citocentrifugación en portaobjetos de vidrio y fijadas con metanol. La detección se llevó a cabo utilizando sondas de ácido nucleico que son complementarias a e hibridan con secuencias de nucleótidos específicas dentro de las células y tejidos. La sensibilidad de la técnica es tal que los niveles umbral de detección están en el intervalo de 10-20 copias de ARNm por célula.

Sin embargo, la tecnología HIS se enfrenta a una serie de desafíos técnicos que limitan su uso generalizado. En primer lugar, las células inmovilizadas sobre una superficie sólida exhiben pobres cinéticas de hibridación. En segundo lugar, generalmente se requiere la optimización del análisis para un ARNm diana en la selección de la sonda, el marcaje y la detección, para cada sección de tejido en la fijación y permeabilización, y en la hibridación y el lavado. Además, se necesita realizar diversos experimentos para controlar la especificidad de la sonda, para determinar la calidad del ARNm del tejido, y para determinar la eficacia de hibridación del procedimiento experimental. Además de los problemas técnicos, la tecnología HIS actual tiene criterios de funcionamiento relativamente bajos en lo que respecta a su sensibilidad de detección y reproducibilidad. La tasa de falsos positivos es todavía alta a menos que las células de interés se vuelvan a examinar manualmente utilizando su morfología, que consume tiempo y mano de obra intensiva. La tecnología HIS actual tampoco tiene la capacidad de determinar cuantitativamente el nivel de expresión del ARNm o medir simultáneamente la expresión de múltiples ARNm diana dentro de las células, lo que puede proporcionar valiosa información clínica como el aumento de la sensibilidad y especificidad de detección, y la identificación del tipo, fuente y escenario de tumor primario.

Existen cuatro tipos principales de sondas que se utilizan normalmente para realizar la hibridación in situ dentro de las células: sondas de oligonucleótidos (normalmente 20-40 bases de longitud), sondas de ADN de hebra sencilla (200-500 bases de longitud), sondas de ADN de cadena doble, o sondas de ARN (200-5000 bases de longitud). Las sondas de ARN son actualmente las sondas más ampliamente utilizadas para la hibridación in situ, ya que tienen la ventaja de que los híbridos ARN-ARN son muy termoestables y son resistentes a la digestión por ARNasas. La sonda de ARN es un método directo de marcaje que adolece de varias dificultades. En primer lugar, se tienen que preparar sondas marcadas por separado para la detección de cada ARNm de interés. En segundo lugar, es técnicamente difícil detectar la expresión de ARNm múltiplo de interés in situ al mismo tiempo. Como resultado, solo se ha informado recientemente de la detección secuencial de ARNm múltiples utilizando diferentes métodos de marcaje (Schrock et al, 1996; Kosman et al, 2004). Además, con los métodos de marcaje directo, no hay buena manera de controlar la hibridación cruzada potencial con secuencias no específicas en las células. La hibridación in situ con ADN ramificado (ADNr) es un método de marcaje indirecto para detectar ARNm en las células individuales (Player et al, 2001; US 2002 0172950). También se ha evaluado el HIS de ADN ramificado para la detección de secuencias de ácido nucleico en especímenes de tejido (Kenny et al., 2002). Este método utiliza una serie de sondas de oligonucleótidos que tienen una porción que hibrida con el ARNm específico de interés y otra porción que hibrida con el ADNr para la amplificación de la señal y la detección. La HIS con ADNr tiene la ventaja de utilizar sondas de oligonucleótidos no marcadas para la detección de todos los ARNm de interés y la amplificación de la señal y la detección son componentes genéricos en el análisis. Sin embargo, las sondas específicas de genes en la HIS con ADNr necesitan ser teóricamente escrutadas frente a posibles interacciones de hibridación no específica con otras secuencias de ARNm en las células. La hibridación no específica de las sondas de oligonucleótidos en la HIS con ADNr puede convertirse en un problema serio cuando se tiene que utilizar un múltiplo de esas sondas para la detección de los ARNm de baja abundancia. Del mismo modo, aunque es deseable el uso de HIS con ADNr para detectar o cuantificar múltiples ARNm, tal hibridación no específica de las sondas de oligonucleótidos es un problema potencial.

La presente invención supera las dificultades mencionadas anteriormente y proporciona métodos para la detección de ácidos nucleicos en y para la identificación de células individuales. Se obtendrá una comprensión completa de la invención tras la revisión de lo siguiente.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método de detección de uno o más ácidos nucleicos diana en una célula individual, comprendiendo el método:

proporcionar una muestra que comprende una célula, y dicha célula comprende, o se sospecha que comprende, uno o más ácidos nucleicos diana;

para cada ácido nucleico diana, proporcionar

fijación y permeabilización de la célula;

(i) una o más sondas marcadoras, en las que cada sonda marcadora comprende una o más marcas,

(ii) uno o más amplificadores, en los que cada amplificador es capaz de hibridar con una o más sondas marcadoras, y/o

(iii) uno o más preamplificadores, en los que cada amplificador es capaz de hibridar con uno o más amplificadores;

para cada ácido nucleico diana, proporcionar dos o más sondas de captura diferentes, en las que cada una de las dos o más sondas de captura comprende una sección T complementaria a una sección en el ácido nucleico diana y una sección L complementaria a una sección en la sonda marcadora, o en un amplificador o en un preamplificador, y en las que las secciones T son complementarias a regiones no solapantes del ácido nucleico diana y las secciones L son complementarias a regiones no solapantes de la sonda marcadora, el amplificador o el preamplificador;

hibridar, en la célula, las dos o más sondas de captura con una sola copia del ácido nucleico diana, cuando está presente en la célula;

capturar la sonda marcadora con las dos o más sondas de captura, capturando de este modo la sonda marcadora con el ácido nucleico diana hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia de la sonda marcadora, o hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia del amplificador e hibridando las sondas marcadoras con el amplificador; o hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferente con una sola copia del preamplificador e hibridando el uno o más amplificadores con el preamplificador y la una o más sondas marcadoras con cada uno de los uno o más amplificadores; y

detectar una señal de la marca.

En una realización, las dos o más sondas de captura diferentes hibridan con secciones únicas y adyacentes en el ácido nucleico diana.

En otra realización, se realiza la hibridación de las dos o más sondas de captura diferentes con una sola copia de la sonda marcadora, amplificador o preamplificador a una temperatura de hibridación que es mayor que la temperatura de fusión Tm de la sección L de cada sonda de captura individual que se une a la sonda marcadora, amplificador o preamplificador. La temperatura de hibridación puede ser menor que la temperatura de fusión Tm de la sección T de cada sonda de captura individual que se une al ácido nucleico diana.

En otra realización, se realiza la hibridación de las dos o más sondas de captura con una sola copia del ácido nucleico diana a una temperatura de hibridación que es mayor que la temperatura de fusión Tm de la sección T de cada sonda de captura individual que se une al ácido nucleico diana. La temperatura de hibridación puede ser menor que la temperatura de fusión Tm de la sección L de cada sonda de captura individual que se une a la sonda marcadora, amplificador o preamplificador.

En otra realización, el método comprende adicionalmente proporcionar una o más sondas de bloqueo capaces de hibridar con regiones del ácido nucleico diana no ocupadas por las sondas de captura.

En otra realización, se logra cada etapa de hibridación o captura para todos los ácidos nucleicos diana a la vez.

En otra realización, se seleccionan independientemente el uno o más ácidos nucleicos diana del grupo consistente en un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico, un ácido nucleico endógeno de la célula y un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno.

En otra realización, el uno o más ácidos nucleicos diana comprenden un primer ácido nucleico diana que comprende una primera región de un ARNm y un segundo ácido nucleico diana que comprende una segunda región del mismo ARNm.

En otra realización, el uno o más ácidos nucleicos diana comprenden un ácido nucleico de referencia, y en la que el método comprende normalizar la señal del uno o más ácidos nucleicos diana a la señal del ácido nucleico de referencia.

En otra realización, comprende adicionalmente la etapa de correlacionar la intensidad de la señal de cada ácido nucleico diana con la cantidad del ácido nucleico diana correspondiente presente en la célula.

En otra realización, la muestra que comprende la célula deriva de un fluido corporal o de sangre. En otra realización, la muestra comprende una sección de tejido.

En otra realización, la célula está en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. En otra realización, la célula es una célula tumoral circulante.

En otra realización, cada sonda de captura está en configuración “Z”.

La invención se refiere en general a proporcionar métodos de detección de dianas de ácido nucleico en las células individuales, incluidos los métodos de detección de múltiples dianas en una sola célula. Se describen métodos de detección de células individuales, particularmente células raras de grandes poblaciones de células heterogéneas, a través de la detección de ácidos nucleicos. También se describen composiciones, sistemas y kits relacionados.

Por lo tanto, la invención proporciona métodos de detección de dos o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende, o se sospecha que comprende, una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. Se proporcionan una primera sonda marcadora que comprende una primera marca y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. También se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura.

La primera sonda de captura hibrida, en la célula, con la primera diana de ácido nucleico (cuando la primera diana de ácido nucleico está presente en la célula), y la segunda sonda de captura hibrida, en la célula, con la segunda diana de ácido nucleico (cuando la segunda diana de ácido nucleico está presente en la célula). La primera sonda marcadora es capturada con la primera sonda de captura y la segunda sonda marcadora es capturada con la segunda sonda de captura, capturando de este modo la primera sonda marcadora con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda marcadora con la segunda diana de ácido nucleico. A continuación se detectan la primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca. Puesto que las primera y segunda marcas están asociadas con sus respectivas dianas de ácido nucleico a través de las sondas de captura, la presencia de la marca o las marcas en la célula indica la presencia de la diana o dianas de ácido nucleico correspondientes en la célula. Los métodos son opcionalmente cuantitativos. Por lo tanto, se pueden medir la intensidad de la primera señal y la intensidad de la segunda señal, y la intensidad de la primera señal se puede correlacionar con una cantidad de la primera diana de ácido nucleico en la célula mientras que la intensidad de la segunda señal se correlaciona con una cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

Las sondas marcadoras se unen directamente a las sondas de captura. Por ejemplo, se proporcionan una única primera sonda de captura y una única segunda sonda captura, la primera sonda marcadora hibrida con la primera sonda de captura, y la segunda sonda marcadora hibrida con la segunda sonda de captura. En una clase relacionadas de realizaciones, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura y dos o más segundas sondas de captura, puesto que son una pluralidad de las primeras sondas marcadoras (p. ej., dos o más primeras sondas marcadoras idénticas) y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras (p. ej., dos o más segundas sondas marcadoras idénticas). Las dos o más primeras sondas de captura hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y los dos o más segundas sondas de captura hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Una única primera sonda marcadora hibrida con cada una de las primeras sondas de captura, y una única segunda sonda marcadora hibrida con cada una de las segundas sondas de captura.

Según la invención, las sondas marcadoras son capturadas con las sondas de captura indirectamente, por ejemplo, a través de la unión de los preamplificadores y/o amplificadores. Cuando se emplean amplificadores, se proporcionan una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Un primer amplificador hibrida con la primera sonda de captura y con la pluralidad de primeras sondas marcadoras, y un segundo amplificador hibrida con la segunda sonda de captura y con la pluralidad de segundas sondas marcadoras. Alternativamente, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Las dos o más primeras sondas de captura hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y las dos o más segundas sondas de captura hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Un primer amplificador hibrida con cada una de las primera sondas de captura, y la pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida con los primeros amplificadores. Un segundo amplificador hibrida con cada una de las segundas sondas de captura, y la pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida con los segundos amplificadores.

Cuando se emplean preamplificadores, se proporcionan una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Un primer preamplificador hibrida con la primera sonda de captura, una pluralidad de primeros amplificadores hibrida con el primer preamplificador, y la pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida con los primeros amplificadores. Un segundo preamplificador hibrida con la segunda sonda de captura, una pluralidad de segundos amplificadores hibrida con el segundo preamplificador, y la pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida con los segundos amplificadores. En otra clase de realizaciones, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Las dos o más primeras sondas de captura hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y las dos o más segundas sondas de captura hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Un primer preamplificador hibrida con cada una de las primera sondas de captura, una pluralidad de primeros amplificadores hibrida con cada una de los primeros preamplificadores, y la pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida con los primeros amplificadores. Un segundo preamplificador hibrida con cada una de las segundas sondas de captura, una pluralidad de segundos amplificadores hibrida con cada uno de los segundos preamplificadores, y la pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida con los segundos amplificadores.

En las realizaciones en que se emplean dos o más primeras sondas de captura y/o dos o más segundas sondas de captura, las sondas de captura hibridan preferiblemente con secuencias de polinucleótidos no solapantes en su respectiva diana de ácido nucleico.

En una clase de realizaciones, se proporcionan una pluralidad de las primeras sondas marcadoras y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Un primer polinucleótido amplificado se produce mediante amplificación por círculo rodador de un primer polinucleótido circular hibridado con la primera sonda de captura. El primer polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la primera sonda marcadora, y el primer polinucleótido amplificado comprende por tanto una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos de la primera sonda marcadora. La pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida a continuación con el primer polinucleótido amplificado. De un modo similar, se produce un segundo polinucleótido amplificado mediante amplificación por círculo rodador de un segundo polinucleótido circular hibridado con la segunda sonda de captura. El segundo polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos de la segunda sonda marcadora, y el segundo polinucleótido amplificado comprende por tanto una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda marcadora. La pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida a continuación con el segundo polinucleótido amplificado. Los polinucleótidos amplificados permanecen asociados con la sonda o las sondas de captura, y las sondas marcadoras son capturadas de este modo con las dianas de ácido nucleico.

Los métodos son útiles para la detección múltiplex de ácidos nucleicos, incluyendo la detección simultánea de más de dos dianas de ácido nucleico. Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende un tercer ácido nucleico diana, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca, en donde una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primeras y segundas señales, proporcionar al menos una tercera sonda de captura, hibridar en la célula la tercera sonda de captura con la tercera diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula), capturar la tercera sonda marcadora con la tercera sonda de captura, y detectar la tercera señal de la tercera marca. Se detectan simultáneamente de manera similar en la célula si se desea cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico. Cada etapa de hibridación o de captura se lleva a cabo preferiblemente para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo.

Una diana de ácido nucleico puede ser esencialmente cualquier ácido nucleico que se detecte deseablemente en la célula. Por ejemplo, una diana de ácido nucleico puede ser un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico, o similares. La diana de ácido nucleico puede ser un ácido nucleico endógeno a la célula. En cuanto a otro ejemplo, la diana puede ser un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante la infección de la célula con un patógeno, por ejemplo, un ARN o ADN genómico viral o bacteriano, un plásmido, un ARNm viral o bacteriano, o similares.

Las primera y segunda (y/o opcionales tercera, cuarta, etc.) dianas de ácido nucleico pueden ser parte de una sola molécula de ácido nucleico, o pueden ser moléculas separadas. En una clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm. En otra clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera región de un ARNm y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda región del mismo ARNm. En otra clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico. Las primera y segunda secuencias de polinucleótidos de ADN cromosómico están localizadas opcionalmente en el mismo cromosoma, por ejemplo, dentro del mismo gen, o en diferentes cromosomas.

En un aspecto, la señal o señales de la diana o dianas de ácido nucleico se normalizan. En una clase de realizaciones, la segunda diana de ácido nucleico comprende un ácido nucleico de referencia, y el método incluye la normalización de la primera señal a la segunda señal. La marca (primera, segunda, tercera, etc.) puede ser esencialmente cualquier marca conveniente que proporcione directa o indirectamente una señal detectable. En un aspecto, la primera marca es una primera marca fluorescente y la segunda marca es una segunda marca fluorescente.

Los métodos se pueden utilizar para detectar la presencia de las dianas de ácido nucleico en las células de esencialmente cualquier tipo de muestra. Por ejemplo, la muestra puede estar derivada de un fluido corporal tal como sangre. Los métodos para la detección de dianas de ácido nucleico en las células se pueden utilizar para identificar las células. Por ejemplo, se puede identificar que una célula es de un tipo deseado basándose en qué ácidos nucleicos contiene, y a qué niveles. Por lo tanto, los métodos incluyen la identificación de la célula como una célula diana deseada basándose en la detección de las primeras y segundas señales (y opcionales tercera, cuarta señales, etc.) dentro de la célula. Por mencionar algunos pocos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral circulante, una célula infectada viralmente, una célula fetal en sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica, o una célula endotelial, célula endotelial precursora o célula miocárdica en la sangre.

La célula se fija y permeabiliza antes de la hibridación de las sondas de captura, para retener las dianas de ácido nucleico en la célula y permitir que las sondas de captura, las sondas marcadoras, etc., entren en la célula. La célula se lava opcionalmente para eliminar los materiales no capturados por una de las dianas de ácido nucleico. La célula se puede lavar después de cualquiera de las diversas etapas, por ejemplo, después de la hibridación de las sondas de captura con las dianas de ácido nucleico para eliminar las sondas de captura no unidas, después de la hibridación de los preamplificadores, los amplificadores, y/o las sondas marcadoras con las sondas de captura, y/o similares. Resultará evidente que la diana o las dianas de ácido nucleico de doble hebra son preferiblemente desnaturalizadas, p. ej., con calor, antes de la hibridación de la sonda o las sondas de captura correspondientes con la diana o las dianas.

Preferiblemente, la célula está en suspensión para todas o la mayoría de las etapas del método. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o la célula está en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. En otras realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula, y la célula se fija sobre un sustrato durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. Por ejemplo, la célula puede estar en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y lavado opcionales e inmovilizada sobre un sustrato durante la etapa de detección. En realizaciones en que la célula está en suspensión, las primera y segunda (y opcional tercera, etc.) señales se pueden detectar convenientemente mediante citometría de flujo. Las señales procedentes de las marcas se detectan típicamente en una sola operación.

Los métodos de la invención pueden usarse para someter a ensayo un nivel relativo de uno o más ácidos nucleicos diana en una célula individual. Para esto, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende o se sospecha que comprende un primer ácido nucleico diana, y comprende un segundo ácido nucleico de referencia. También se proporcionan una primera sonda marcadora que comprende una primera marca y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. En la célula, la primera sonda marcadora se captura con el primer ácido nucleico diana (cuando está presente en la célula) y la segunda sonda marcadora se captura con el segundo ácido nucleico de referencia. La primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca se detectan a continuación en la célula individual, y se mide la intensidad de cada señal. La intensidad de la primera señal es normalizada a la intensidad de la segunda señal (referencia). De este modo se someten a ensayo el nivel del primer ácido nucleico diana con respecto al nivel del segundo ácido nucleico de referencia en la célula, ya que las primera y segunda marcas están asociadas con sus respectivos ácidos nucleicos. Los métodos son opcionalmente cuantitativos, permitiendo la medición de la cantidad del primer ácido nucleico diana con respecto a la cantidad del segundo ácido nucleico de referencia en la célula. Por lo tanto, la intensidad de la primera señal normalizada con respecto a la de la segunda señal se puede correlacionar con una cantidad del primer ácido nucleico diana presente en la célula.

Las sondas marcadoras se pueden unir directamente a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, la primera sonda marcadora puede hibridar con el primer ácido nucleico diana y/o la segunda sonda marcadora puede hibridar con el segundo ácido nucleico de referencia. Alternativamente, las sondas marcadoras se pueden unir indirectamente a los ácidos nucleicos, por ejemplo, a través de sondas de captura. En una clase de realizaciones, se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura. En la célula, la primera sonda de captura hibrida con el primer ácido nucleico diana y la segunda sonda de captura hibrida con el segundo ácido nucleico de referencia. La primera sonda marcadora es capturada con la primera sonda de captura y la segunda sonda marcadora es capturada con la segunda sonda de captura, capturando de este modo la primera sonda marcadora con el primer ácido nucleico diana y la segunda sonda marcadora con el segundo ácido nucleico de referencia. Las características descritas para los métodos anteriores se aplican también a estas realizaciones, con respecto a la configuración y al número de sondas marcadoras y de captura, el uso opcional de preamplificadores y/o amplificadores, la amplificación por círculo rodador de polinucleótidos circulares, y similares.

Los métodos se pueden utilizar para la detección múltiplex de ácidos nucleicos, incluyendo la detección simultánea de dos o más ácidos nucleicos diana. Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende un tercer ácido nucleico diana, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca, en donde una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primeras y segundas señales; capturar, en la célula, la tercera sonda marcadora con el tercer ácido nucleico diana (cuando está presente en la célula); detectar la tercera señal de la tercera marca, cuya detección comprende medir una intensidad de la tercera señal; y normalizar la intensidad de la tercera señal a la intensidad de la segunda señal. Si se desea, se detectan simultáneamente cuartos, quintos, sextos, etc. ácidos nucleicos de una manera similar en la célula.

Los métodos para someter a ensayo niveles relativos de ácidos nucleicos diana en las células se pueden utilizar para identificar las células. Por ejemplo, se puede identificar que una célula es de un tipo deseado basándose en qué ácidos nucleicos contiene, y en qué niveles. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, los métodos incluyen la identificación de la célula como una célula diana deseada basándose en la primera señal normalizada (y las tercera, cuarta, etc. señales normalizadas opcionales).

Esencialmente se aplican también todas las características señaladas para los métodos anteriores a estos métodos,

según corresponda; por ejemplo, con respecto al tipo de ácidos nucleicos diana y de referencia, al tipo de célula, la fuente de la muestra, la fijación y permeabilización de la célula, el lavado de la célula, la desnaturalización de los ácidos nucleicos diana y de referencia de doble hebra, el tipo de marcas, el uso de sondas de bloqueo opcionales, la detección de señales, la detección (y medición de la intensidad) mediante citometría de flujo o microscopía, la presencia de la célula en suspensión o inmovilizada sobre un sustrato, y/o similares.

Los métodos de la invención pueden usarse también para realizar el análisis comparativo de la expresión génica en células individuales. Para esto, se proporciona una primera población celular mixta que comprende una o más células de un tipo especificado. Se mide un nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos diana con respecto a un ácido nucleico de referencia en las células del tipo especificado de la primera población, para proporcionar un primer perfil de expresión. También se proporciona una segunda población celular mixta que comprende una o más células del tipo especificado, y se mide un nivel de expresión de los uno o más ácidos nucleicos diana con respecto al ácido nucleico de referencia en las células del tipo especificado de la segunda población, para proporcionar un segundo perfil de expresión. A continuación se comparan los primeros y segundos perfiles de expresión.

Esencialmente se aplican también todas las características señaladas para los métodos anteriores a estos métodos, según corresponda; por ejemplo, con respecto al tipo de ácidos nucleicos diana y de referencia, al tipo de célula, la fuente de la muestra, la fijación y permeabilización de la célula, el lavado de la célula, la desnaturalización de los ácidos nucleicos diana y de referencia de doble hebra, el tipo de marcas, el uso y la configuración de las sondas marcadoras, las sondas de captura, los preamplificadores y/o amplificadores, el uso de sondas de bloqueo opcionales, la detección de señales, la detección (y medición de la intensidad) mediante citometría de flujo o microscopía, la presencia de la célula en suspensión o inmovilizada sobre un sustrato, y/o similares.

Los métodos de la invención pueden usarse para facilitar la asociación de una alta densidad de marcas de ácidos nucleicos diana en las células. En general, estos son métodos de detección de dos o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende o se sospecha de que comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. En la célula, una primera marca se captura con la primera diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula) y una segunda marca se captura con la segunda diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula). Una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. Como se ha señalado, las marcas son capturadas a alta densidad. Por lo tanto, se captura un promedio de al menos una copia de la primera marca por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico con la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y se captura un promedio de al menos una copia de la segunda marca por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico con la segunda diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico. Se detectan la primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca.

Específicamente, se captura un promedio de al menos cuatro, ocho, o doce copias de la primera marca por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico con la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y se captura un promedio de al menos cuatro, ocho, o doce copias de la segunda marca por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico con la segunda diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico. En una realización, se captura un promedio de al menos dieciséis copias de la primera marca por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico con la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y se captura un promedio de al menos dieciséis copias de la segunda marca por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico con la segunda diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico.

Esencialmente se aplican también todas las características señaladas para los métodos anteriores a estas realizaciones, según corresponda, por ejemplo, con respecto al tipo de marcas, la detección de señales, el tipo, el tratamiento, y la suspensión de la célula, y/o similares. Una densidad similar de las tercera, cuarta, quinta, sexta, etc. marcas se captura opcionalmente con las tercera, cuarta, quinta, sexta, etc. dianas de ácido nucleico.

Los métodos de la invención pueden usarse para detectar una célula individual de un tipo especificado. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende una mezcla de tipos de células incluyendo al menos una célula del tipo especificado. Se proporcionan una primera sonda marcadora que comprende una primera marca y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. En la célula, la primera sonda marcadora se captura con un primer ácido nucleico diana (cuando la primera diana de ácido nucleico está presente en la célula) y la segunda sonda marcadora se captura con una segunda diana de ácido nucleico (cuando la segunda diana de ácido nucleico está presente en la célula). La primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca se detectan y se correlacionan con la presencia, ausencia o cantidad de las correspondientes primera y segunda dianas de ácido nucleico en la célula. Se identifica que la célula es del tipo especificado basándose en la detección de la presencia, ausencia o cantidad de la primera y la segunda dianas de ácido nucleico dentro de la célula, donde el tipo especificado de célula es distinguible del otro tipo o los otros tipos de células en la mezcla basándose en la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico o la presencia, ausencia o

cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula (es decir, las dianas de ácido nucleico son redundantes para los marcadores del tipo de célula especificado). Opcionalmente se miden y correlacionan la intensidad de la primera señal y la intensidad de la segunda señal con una cantidad del correspondiente ácido nucleico presente en la célula. Por ejemplo, la célula comprende un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, y se identifica que la célula es del tipo especificado basándose en la detección de la presencia o cantidad de la primera y la segunda dianas de ácido nucleico dentro de la célula, donde el tipo especificado de célula es distinguible del otro tipo o de los otros tipos de célula en la mezcla basándose en la presencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico o la presencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

Las sondas marcadoras pueden unirse directamente a las dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera sonda marcadora puede hibridar con la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda sonda marcadora puede hibridar con la segunda diana de ácido nucleico. Según la invención, las sondas marcadoras son capturadas con las dianas de ácido nucleico a través de sondas de captura. En un aspecto, se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura. En la célula, la primera sonda de captura hibrida con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda de captura hibrida con la segunda diana de ácido nucleico. La primera sonda marcadora es capturada con la primera sonda de captura y la segunda sonda marcadora es capturada con la segunda sonda de captura, capturando de este modo la primera sonda marcadora con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda marcadora con la segunda diana de ácido nucleico. Las características descritas para los métodos anteriores se aplican también a estas realizaciones, con respecto a la configuración y al número de las sondas marcadoras y de captura, el uso opcional de preamplificadores y/o amplificadores, la amplificación por círculo rodador de polinucleótidos circulares, y similares.

Opcionalmente se detectan en la célula las tercera, cuarta, quinta, etc. dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, el método incluye opcionalmente: proporcionar una tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca, en donde una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primeras y segundas señales, capturar en la célula la tercera sonda marcadora con una tercera diana de ácido nucleico (cuando la tercera diana está presente en la célula), y detectar la tercera señal de la tercera marca. Las tercera, cuarta, quinta, etc. sondas marcadoras opcionalmente hibridan directamente con su ácido nucleico correspondiente, o pueden ser capturadas indirectamente a través de sondas de captura como se describe para las primera y segunda sondas marcadoras.

La primera y/o segunda señal se puede normalizar a la tercera señal. Por lo tanto, algunas veces, la célula comprende la tercera diana de ácido nucleico, y los métodos incluyen la identificación de que la célula es del tipo especificado basándose en la primera y/o segunda señal normalizada, por ejemplo, en métodos en que el tipo de célula diana es distinguible del otro tipo u otros tipos de células en la mezcla basándose en el número de copias de las primera y/o segunda dianas de ácido nucleico, en lugar de puramente en su presencia en el tipo de célula diana y no en el otro u otros tipos celulares.

Como ejemplo adicional, la tercera diana de ácido nucleico puede servir como un tercer marcador redundante para el tipo de célula diana, por ejemplo, para mejorar la especificidad del análisis para el tipo de célula deseado. Por lo tanto, los métodos incluyen la correlación de la tercera señal detectada a partir de la célula con la presencia, ausencia o cantidad de la tercera diana de ácido nucleico en la célula, y la identificación de la célula como del tipo especificado basándose en la detección de la presencia, ausencia, o la cantidad de las primera, segunda y tercera dianas de ácido nucleico, dentro de la célula, en donde el tipo especificado de célula es distinguible del otro u otros tipos de células en la mezcla basándose en la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico, la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico, o la presencia, ausencia o cantidad de la tercera diana de ácido nucleico en la célula.

Los métodos pueden aplicarse a la detección y la identificación incluso de tipos raros de células. Por ejemplo, la proporción de células del tipo especificado con respecto a las células de todos los otros tipos en la mezcla es opcionalmente menos de $1:1x10^4$, menos de $1:1x10^5$, menos de $1:1x10^6$, menos de $1:1x10^7$, menos de $1:1x10^8$, o incluso menos de $1:1x10^9$.

Esencialmente todas las características señaladas por los métodos anteriores se aplican también a estos métodos y, en su caso; por ejemplo, con respecto al tipo de dianas de ácido nucleico, el tipo de célula, la fuente de la muestra, la fijación y la permeabilización de la célula, el lavado de la célula, la desnaturalización de ácidos nucleicos de doble hebra, el tipo de marcas, el uso de sondas de bloqueo opcionales, la detección de señales, la detección (y medición de la intensidad) de las señales de la célula individual mediante citometría de flujo o microscopía, la presencia de la célula en suspensión o inmovilizada sobre un sustrato, y/o similares.

Se describen también en la presente memoria composiciones útiles en la práctica o producidas mediante los métodos. Específicamente se describe una composición que incluye una célula fijada y permeabilizada, cuya célula comprende o se sospecha de que comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico, al menos una primera sonda de captura susceptible de hibridar con la primera diana de ácido nucleico, al menos una segunda sonda de captura susceptible de hibridar con la segunda diana de ácido nucleico, una primera sonda marcadora que comprende una primera marca, y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca. Una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. La célula comprende opcionalmente las primera y segunda sondas de captura y sondas marcadoras. Las primera y

segunda sondas de captura están opcionalmente hibridadas con sus respectivas dianas de ácido nucleico en la célula.

Las características descritas para los métodos anteriores para la captura indirecta de las sondas marcadoras con las dianas de ácido nucleico también se aplican a estas realizaciones, por ejemplo, con respecto a la configuración y al número de sondas marcadoras y de captura, al uso opcional de preamplificadores y/o amplificadores, y similares.

Específicamente, la composición comprende una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, una pluralidad de las segundas sondas marcadoras, un primer polinucleótido amplificado producido mediante amplificación por círculo rodador de un primer polinucleótido circular hibridado con la primera sonda de captura, y un segundo polinucleótido amplificado producido mediante amplificación por círculo rodador de un segundo polinucleótido circular hibridado con la segunda sonda de captura. El primer polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la primera sonda marcadora, y el primer polinucleótido amplificado comprende una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la primera sonda marcadora. El segundo polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda marcadora, y el segundo polinucleótido amplificado comprende una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda marcadora. La composición también puede incluir reactivos necesarios para la producción de los polinucleótidos amplificados, por ejemplo, una polimerasa de ácido nucleico suministrada exógenamente, una ligasa de ácido nucleico suministrada exógenamente, y/o nucleósidos trifosfato suministrados exógenamente (p. ej., dNTP).

La célula incluye opcionalmente dianas de ácido nucleico adicionales, y la composición (y célula) puede incluir reactivos para la detección de estas dianas. Por ejemplo, la célula puede comprender o se puede sospechar que comprende una tercera diana de ácido nucleico, y la composición puede incluir al menos una tercera sonda de captura susceptible de hibridar con la tercera diana de ácido nucleico y la tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca. Una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primeras y segundas señales. La célula incluye opcionalmente una cuarta, quinta, sexta, etc. dianas de ácido nucleico, y la composición incluye opcionalmente una cuarta, quinta, sexta, etc. sondas marcadoras y sondas de captura.

La célula puede estar presente en una mezcla de células, por ejemplo, una mezcla heterogénea compleja. Específicamente, la célula es de un tipo especificado, y la composición comprende uno o más de otros tipos de células. Estas otras células pueden estar presentes en exceso, incluso gran exceso, de la célula. Por ejemplo, la proporción de células del tipo especificado con respecto a las células de todos los otros tipos en la composición es opcionalmente menos de $1:1x10^4$, menos de $1:1x10^5$, menos de $1:1x10^6$, menos de $1:1x10^7$, menos de $1:1x10^8$, o incluso menos de $1:1x10^9$.

Esencialmente se aplican también a estas composiciones todas las características señaladas para los métodos anteriores, según corresponda; por ejemplo, con respecto al tipo de diana de ácido nucleico, el tipo y fuente de la célula, la ubicación de diversas dianas en una sola molécula o en moléculas diferentes, el tipo de marcas, la inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares. La célula está opcionalmente en suspensión en la composición.

Por lo tanto, se describe en la presente memoria una composición que comprende una célula, cuya célula incluye una primera diana de ácido nucleico, una segunda diana de ácido nucleico, una primera marca cuya presencia en la célula es indicativa de la presencia de la primera diana de ácido nucleico en la célula, y una segunda marca cuya presencia en la célula es indicativa de la presencia de la segunda diana de ácido nucleico en la célula, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. Está presente un promedio de al menos una copia de la primera marca en la célula por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y está presente un promedio de al menos una copia de la segunda marca en la célula por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico.

Las copias de la primera marca pueden asociarse físicamente con el primer ácido nucleico diana, y las copias de la segunda marca pueden asociarse físicamente con la segunda diana de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera marca puede ser parte de una primera sonda marcadora y la segunda marca parte de una segunda sonda marcadora, donde se capturan las sondas marcadoras con los ácidos nucleicos diana.

Esencialmente todas las características mencionadas anteriormente para los métodos y composiciones se aplican también a estas composiciones, según corresponda, por ejemplo, con respecto al tipo y la cantidad de marcas, la suspensión de la célula, y/o similares. Una densidad parecida de marcas está presente opcionalmente para las tercera, cuarta, quinta, sexta, etc. dianas de ácido nucleico.

En la presente memoria se describen también equipos útiles para la práctica de los métodos. Se describe específicamente un kit para la detección de una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico en una célula individual. El kit incluye al menos un reactivo para la fijación y/o permeabilización de la célula,

al menos una primera sonda de captura susceptible de hibridar con el primer ácido nucleico diana, al menos una segunda sonda de captura susceptible de hibridar con la segunda diana de ácido nucleico, una primera sonda marcadora que comprende una primera marca, y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca, empaquetados en uno o más recipientes.

Esencialmente todas las características señaladas anteriormente para los métodos y composiciones se aplican también a los kits, según corresponda; por ejemplo, con respecto al número de dianas de ácido nucleico, la configuración y el número de las sondas marcadoras y de captura, la inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, la inclusión de sondas de bloqueo, la inclusión de reactivos de amplificación, el tipo de diana de ácido nucleico, la ubicación de las diversas dianas en una sola molécula o en diferentes moléculas, el tipo de marcas, la inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares.

Se describe en la presente memoria un kit para detectar una célula individual de un tipo especificado a partir de una mezcla de tipos de células mediante la detección de una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. El kit incluye al menos un reactivo para la fijación y/o permeabilización de la célula, una primera sonda marcadora que comprende una primera marca, y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca, empaquetados en uno o más recipientes. El tipo especificado de célula es distinguible de los otros tipos de células en la mezcla por la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico en la célula o por la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

Esencialmente todas las características señaladas anteriormente para los métodos y composiciones se aplican también a estas realizaciones, según corresponda; por ejemplo, con respecto al número de dianas de ácido nucleico, la inclusión de sondas de captura, la configuración y número de las sondas marcadoras y/o de captura, la inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, la inclusión de sondas de bloqueo, la inclusión de reactivos de amplificación, el tipo de diana de ácido nucleico, la ubicación de diversas dianas en una sola molécula o en moléculas diferentes, el tipo de marcas, la inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra esquemáticamente el flujo de trabajo de la tecnología QMAGEX para una realización ejemplar.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente un enfoque de marcaje directo en el que las sondas marcadoras hibridan con el ácido nucleico diana.

La Figura 3 ilustra esquemáticamente un enfoque de marcaje indirecto en el que las sondas marcadoras hibridan con sondas de captura hibridadas con el ácido nucleico diana.

La Figura 4 ilustra esquemáticamente un enfoque de diseño de sonda de captura de marcaje indirecto que utiliza un par de sondas de captura independientes para mejorar la especificidad de captura de la sonda marcadora por el ácido nucleico diana.

La Figura 5 ilustra esquemáticamente un enfoque de diseño de sonda de captura de marcaje indirecto que utiliza tres o más sondas de captura independientes para mejorar la especificidad de captura de la sonda marcadora por el ácido nucleico diana.

La Figura 6 ilustra esquemáticamente enfoques de diseño de sondas para detectar múltiples moléculas diana en paralelo utilizando marcaje directo (Panel A) o marcaje indirecto con dos sondas de captura independientes (Panel B).

La Figura 7 ilustra esquemáticamente enfoques de diseño de sondas para reducir tasas de falsos positivos en la identificación de células raras anclando varios tipos de partículas generadoras de señal (marcas) a la misma molécula diana. El Panel A muestra múltiples tipos de partículas generadoras de señal (marcas) en una única diana. El Panel B muestra múltiples tipos de partículas generadoras de señal (marcas) en más de una diana, donde se mantienen las intensidades de señal relativas de la serie de partículas a través de todas las dianas. El Panel C muestra un conjunto de partículas generadoras de señal (marcas) en una molécula diana, donde diferentes dianas tienen conjuntos característicamente diferentes.

La Figura 8 Paneles A-D ilustra esquemáticamente diferentes estructuras de los amplificadores ilustrativos.

La Figura 9 ilustra esquemáticamente la utilización de la amplificación por círculo rodador para amplificar la señal. Como se muestra en el Panel A, una molécula de nucleótidos circular se ancla a la sonda o las sondas de captura. Como se muestra en el Panel B, aparece una molécula de cadena larga con muchas secuencias repetidas como resultado de la amplificación por círculo rodador. Como se muestra en el Panel C, se pueden hibridan muchas sondas señal con las secuencias repetidas para lograr la amplificación de la señal.

La Figura 10 ilustra esquemáticamente una realización de la configuración del aparato de análisis.

Las Figuras esquemáticas no están necesariamente a escala.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece la invención. Las siguientes definiciones complementan las de la técnica y se dirigen a la aplicación actual y no deben ser imputadas a ningún caso relacionado o no relacionado, p. ej., a cualquier patente o solicitud del mismo propietario.

Según se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye una pluralidad de tales moléculas, y similares.

El término "aproximadamente" según se utiliza en la presente memoria indica el valor de una cantidad dada que varía en +/- 10% del valor, u opcionalmente +/- 5% del valor, o en algunas realizaciones, en +/- 1% del valor así descrito.

El término "polinucleótido" (y el término equivalente "ácido nucleico") abarca cualquier cadena física de unidades monoméricas que se puede corresponder a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (p. ej., un polímero de ADN o ARN típico), ácidos peptidonucleicos (PNA), oligonucleótidos modificados (p. ej., oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no son típicos de ARN o ADN biológico, 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 conectados por enlaces fosfodiéster, o por enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato, enlaces boranofosfato, o similares. El polinucleótido puede comprender adicionalmente elementos no nucleotídicos tales como marcas, grupos extintores, grupos de bloqueo, o similares. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, de doble hebra o de hebra sencilla.

Una "diana de ácido nucleico" o "ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico, u opcionalmente una región del mismo, que se va a detectar.

Una "secuencia de polinucleótidos" o "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 el ácido nucleico proporcionado o la secuencia de polinucleótidos complementaria (p. ej., el ácido nucleico complementario).

El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Los genes incluyen típicamente secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para la expresión de dichas secuencias codificantes. El término gen se puede aplicar a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificados por esa secuencia genómica. Los genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresado que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen promotores y potenciadores, a los que se unen proteínas reguladoras tales como factores de transcripción, dando como resultado la transcripción de las secuencias adyacentes o cercanas.

Dos polinucleótidos "hibridan" cuando se asocian para formar un dúplex estable, p. ej., en condiciones de análisis relevantes. Los ácidos nucleicos hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como los enlaces de hidrógeno, la exclusión de disolvente, el apilamiento de bases y similares. Una extensa guía 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, Nueva York), así como en Ausubel, *infra*.

Un primer polinucleótido "susceptible de hibridar" con un segundo polinucleótido contiene una primera secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una segunda secuencia de polinucleótidos en el segundo polinucleótido. Los primeros y segundos polinucleótidos son capaces de formar un dúplex estable, p. ej., bajo condiciones de análisis relevantes.

La "T_m" (Temperatura de fusión) de un dúplex de ácido nucleico bajo condiciones especificadas (p. ej., condiciones de análisis relevantes) es la temperatura a la cual la mitad de los pares de bases en una población del dúplex se disocia y la mitad se asocia. La T_m para un dúplex concreto, se puede calcular y/o medir, p. ej., mediante la obtención de una curva de desnaturalización térmica del dúplex (donde la T_m es la temperatura correspondiente al punto medio en la transición observada de la forma de doble hebra a hebra sencilla).

El término "complementario" se refiere a un polinucleótido que forma un dúplex estable con su "complemento", p. ej., bajo condiciones de análisis relevantes. Típicamente, dos secuencias de polinucleótidos que son complementarias entre sí tienen emparejamientos erróneos al menos en aproximadamente 20% de las bases, al menos en aproximadamente 10% de las bases, preferiblemente al menos en aproximadamente 5% de las bases, y más preferiblemente no tienen emparejamientos erróneos.

Una "marca" es un radical que facilita la detección de una molécula. Las marcas comunes en el contexto de la presente invención incluyen marcas fluorescentes, luminiscentes, de dispersión de luz, y/o colorimétricas. Las marcas adecuadas incluyen enzimas y radicales fluorescentes, así como radionúclidos, sustratos, cofactores, inhibidores, radicales quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Las patentes que ilustran el uso de tales marcadores incluyen las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Muchas marcas son asequibles comercialmente y se pueden utilizar en el contexto de la invención.

El término "sonda marcadora" se refiere a una entidad que se une a una molécula diana, directamente o indirectamente, y permite que la diana sea detectada, p. ej., por medio de un instrumento de lectura. Una sonda marcadora (o "LP" en sus siglas inglesas) es típicamente un polinucleótido de hebra sencilla que comprende al menos una marca que proporciona directa o indirectamente una señal detectable. La marca puede unirse covalentemente al polinucleótido, o el polinucleótido puede ser configurado para unirse a la marca (p. ej., un polinucleótido biotinilado se puede unir a una marca con estreptavidina asociada). La sonda marcadora puede, por ejemplo, hibridar directamente con un ácido nucleico diana, o puede hibridar con un ácido nucleico que a su vez hibrida con el ácido nucleico diana o con uno o más ácidos nucleicos diferentes que hibridan con el ácido nucleico. Por lo tanto, la sonda marcadora puede comprender una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico diana, o puede comprender al menos una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos en una sonda de captura, amplificador, o similares.

Una "sonda de captura" es un polinucleótido que es susceptible de hibridar con un ácido nucleico diana y capturar una sonda marcadora para ese ácido nucleico diana. La sonda de captura puede hibridar directamente con la sonda marcadora, o puede hibridar con uno o más ácidos nucleicos que a su vez hibridan con la sonda marcadora; por ejemplo, la sonda de captura puede hibridar con un amplificador o un preamplificador. Así pues, la sonda de captura incluye una primera secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico diana y una segunda secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos de la sonda marcadora, el amplificador, el preamplificador, o similares. La sonda de captura es preferiblemente de hebra sencilla.

Un "amplificador" es una molécula, típicamente un polinucleótido, que es susceptible de hibridar con múltiples sondas marcadoras. Típicamente, el amplificador hibrida con múltiples sondas marcadoras idénticas. El amplificador también hibrida con al menos una sonda de captura o ácido nucleico unido a una sonda de captura. Por ejemplo, el amplificador puede hibridar con al menos una sonda de captura y con una pluralidad de sondas marcadoras, o con un preamplificador y una pluralidad de sondas marcadoras. El amplificador puede ser, p. ej., un ácido nucleico lineal, bifurcado, en forma de peine, o ramificado. Como se ha indicado para todos los polinucleótidos, el amplificador puede incluir nucleótidos modificados y/o conexiones internucleótido no convencionales, así como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o enlaces fosfodiéster convencionales. Los amplificadores adecuados se describen, p. ej., en los documentos USPN 5.635.352, USPN 5.124.246, USPN 5.710.264, y USPN 5.849.481.

Un "preamplificador" es una molécula, típicamente un polinucleótido, que sirve como un intermedio entre una o más sondas de captura y amplificadores. Típicamente, el preamplificador hibrida simultáneamente con una o más sondas de captura y con una pluralidad de amplificadores. Los preamplificadores ilustrativos se describen, p. ej., en los documentos USPN 5.635.352 y USPN 5.681.697.

Un "patógeno" es un agente biológico, típicamente un microorganismo, que causa la enfermedad o la dolencia a su anfitrión.

Un "microorganismo" es un organismo de tamaño microscópico o submicroscópico. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, bacterias, hongos, levaduras, protozoos, algas microscópicas (p. ej., algas unicelulares), virus (que típicamente se incluyen en esta categoría, aunque no son susceptibles de crecimiento y reproducción fuera de las células anfitrionas), agentes subvirales, viroides y micoplasmas.

En la presente memoria se define o caracteriza de otra manera una variedad de términos adicionales.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un método de detección de uno o más ácidos nucleicos diana en una célula individual, comprendiendo el método:

proporcionar una muestra que comprende una célula, y dicha célula comprende, o se sospecha que comprende, uno o más ácidos nucleicos diana;

fijar y permeabilizar la célula;

para cada ácido nucleico diana, proporcionar

(i) una o más sondas marcadoras, en las que cada sonda marcadora comprende una o más marcas,

(ii) uno o más amplificadores, en los que cada amplificador es capaz de hibridar con una o más sondas marcadoras, y/o

(iii) uno o más preamplificadores, en los que cada preamplificador es capaz de hibridar con uno o más amplificadores;

para cada ácido nucleico diana, proporcionar dos o más sondas de captura diferentes, en las que cada una de las dos o más sondas de captura comprende una sección T complementaria a una sección en el ácido nucleico diana y una sección L complementaria a una sección en la sonda marcadora, o en un amplificador o en un preamplificador, y en las que las secciones T son complementarias a regiones no solapantes del ácido nucleico diana y las secciones L son complementarias a regiones no solapantes de la sonda marcadora, el amplificador o el preamplificador;

hibridar, en la célula, las dos o más sondas de captura con una sola copia del ácido nucleico diana, cuando está presente en la célula;

capturar la sonda marcadora con las dos o más sondas de captura, capturando de este modo la sonda marcadora con el ácido nucleico diana hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia de la sonda marcadora, o hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia del amplificador e hibridando las sondas marcadoras con el amplificador; o hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia del preamplificador e hibridando el uno o más amplificadores con el preamplificador y la una o más sondas marcadoras con cada uno de los uno o más amplificadores; y detectar una señal de la marca.

La presente invención se refiere en general a análisis múltiplex que se pueden utilizar para la detección simultánea, y opcionalmente la cuantificación, de dos o más dianas de ácido nucleico en una sola célula. Son un aspecto relacionado de la invención métodos para detectar el nivel de uno o más ácidos nucleicos diana respecto al de un ácido nucleico de referencia en una célula individual.

En general, en los análisis de la invención, una sonda marcadora es capturada con cada ácido nucleico diana. La sonda marcadora puede ser capturada con la diana a través de la unión directa de la sonda marcadora a la diana. Preferiblemente, sin embargo, la sonda marcadora es capturada indirectamente a través de la unión a las sondas de captura, amplificadores, y/o preamplificadores que se unen a la diana. El uso de los amplificadores y preamplificadores opcionales facilita la captura de múltiples copias de la sonda marcadora con la diana, amplificando así la señal de la diana sin necesidad de amplificación enzimática de la propia diana. La unión de las sondas de captura es opcionalmente cooperativa, reduciendo el fondo causado por la hibridación cruzada no deseada de las sondas captura con los ácidos nucleicos no diana (un problema mayor en los análisis múltiplex que en los análisis "singleplex" puesto que se deben utilizar más sondas en los análisis múltiplex, aumentando la probabilidad de hibridación cruzada).

La invención se refiere adicionalmente a la detección de células individuales, incluyendo la detección de células raras partir de una mezcla heterogénea de células. Las células individuales se detectan mediante la detección de ácidos nucleicos cuya presencia, ausencia, número de copias, o similares son característicos de la célula.

También se describen composiciones, kits y sistemas relacionados con los métodos.

Métodos de detección de ácidos nucleicos y células

Detección múltiplex de ácidos nucleicos

Como se ha indicado, la invención se refiere en general a múltiplex de ácidos nucleicos en células individuales. Por lo tanto, una clase general de realizaciones incluye métodos de detección de dos o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende, o se sospecha de que comprende, un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana. Se proporcionan una primera sonda marcadora que comprende una primera marca y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. También se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura.

La primera sonda de captura hibrida, en la célula, con la primera diana de ácido nucleico (cuando la primera diana de ácido nucleico está presente en la célula), y la segunda sonda de captura hibrida, en la célula, con la segunda diana de ácido nucleico (cuando el segundo ácido nucleico diana está presente en la célula). La primera sonda marcadora es capturada con la primera sonda de captura y la segunda sonda marcadora es capturada con la segunda sonda de captura, capturando de este modo la primera sonda marcadora con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda marcadora con la segunda diana de ácido nucleico. A continuación se detectan la primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca. Puesto que las primera y segunda marcas están asociadas con sus respectivas dianas de ácido nucleico a través de las sondas de captura, la presencia de la marca o las marcas en la célula indica la presencia de la diana o las dianas de ácido nucleico correspondientes en la célula. Los métodos son opcionalmente cuantitativos. Por lo tanto, se pueden medir la

intensidad de la primera señal y la intensidad de la segunda señal, y la intensidad de la primera señal se puede correlacionar con una cantidad de la primera diana de ácido nucleico en la célula mientras que la intensidad de la segunda señal se correlaciona con una cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

Las sondas marcadoras pueden unirse directamente a las sondas de captura. Por ejemplo, se proporcionan una única primera sonda de captura y una única segunda sonda de captura, la primera sonda marcadora hibrida con la primera sonda de captura, y la segunda sonda marcadora hibrida con la segunda sonda de captura. En una clase relacionada de realizaciones, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura y dos o más segundas sondas de captura, ya que son una pluralidad de las primeras sondas marcadoras (p. ej., dos o más primeras sondas marcadoras idénticas) y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras (p. ej., dos o más segundas sondas marcadoras idénticas). Las dos o más primeras sondas de captura hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y las dos o más segundas sondas de captura hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Una única primera sonda marcadora hibrida con cada una de las primera sondas de captura, y una única segunda sonda marcadora hibrida con cada una de las segundas sondas de captura.

Según la invención, las sondas marcadoras son capturadas con las sondas de captura indirectamente, por ejemplo, a través de la unión de los preamplificadores y amplificadores. El uso de amplificadores y preamplificadores puede ser ventajoso en el aumento de intensidad de la señal, ya que puede facilitar la unión de un gran número de sondas marcadoras a cada diana de ácido nucleico.

En métodos en que se emplean amplificadores, se proporcionan una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Un primer amplificador hibrida con la primera sonda de captura y con la pluralidad de primeras sondas marcadoras, y un segundo amplificador hibrida con la segunda sonda de captura y con la pluralidad de segundas sondas marcadoras. Alternativamente, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Las dos o más primeras sondas de captura hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y las dos o más segundas sondas de captura hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Un primer amplificador hibrida con cada una de las primeras sondas de captura, y la pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida con los primeros amplificadores. Un segundo amplificador hibrida con cada una de las segundas sondas de captura, y la pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida con los segundos amplificadores.

Cuando se emplean preamplificadores, se proporcionan una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Un primer preamplificador hibrida con la primera sonda de captura, una pluralidad de primeros amplificadores hibrida con el primer preamplificador, y la pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida con los primeros amplificadores. Un segundo preamplificador hibrida con la segunda sonda de captura, una pluralidad de segundos amplificadores hibrida con el segundo preamplificador, y la pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida con los segundos amplificadores. Alternativamente, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Las dos o más primeras sondas de captura hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y las dos o más segundas sondas de captura hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Un primer preamplificador hibrida con cada una de las primeras sondas de captura, una pluralidad de primeros amplificadores hibrida con cada uno de los primeros preamplificadores, y la pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida con los primeros amplificadores. Un segundo preamplificador hibrida con cada una de las segundas sondas de captura, una pluralidad de segundos amplificadores hibrida con cada uno de los segundos preamplificadores, y la pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida con los segundos amplificadores. Opcionalmente, se pueden utilizar preamplificadores adicionales como intermedios entre un preamplificador hibridado a la sonda o sondas de captura y los amplificadores.

En los métodos anteriores, una sonda de captura hibrida con cada sonda marcadora, amplificador, o preamplificador. Alternativamente, dos o más sondas de captura hibridan con la sonda marcadora, amplificador, o preamplificador. Véase, p. ej., la sección de más abajo titulada "Implementación, aplicaciones y ventajas".

En métodos en que se emplean dos o más primeras sondas de captura y/o dos o más segundas sondas de capturas, las sondas de captura hibridan preferiblemente con secuencias de polinucleótidos no solapantes en sus respectivas dianas de ácido nucleico. Las sondas de captura pueden, aunque no es necesario, cubrir una región contigua de la diana de ácido nucleico. Se proporcionan opcionalmente sondas de bloqueo, polinucleótidos que hibridan con regiones de la diana de ácido nucleico no ocupadas por sondas de captura, e hibridan con la diana. Para una diana de ácido nucleico dada, las correspondientes sondas de captura y sondas de bloqueo son preferiblemente complementarias a secuencias no solapantes físicamente distintas en el ácido nucleico diana, cuyas secuencias no solapantes son preferiblemente, pero no necesariamente, contiguas. Tener las sondas de captura y sondas de bloqueo opcionales contiguas entre sí puede en algunas realizaciones aumentar la fuerza de la hibridación, eliminar la estructura secundaria, y asegurar la señal más consistente y reproducible.

En muchos métodos, tales como los anteriores, no se requiere manipulación enzimática para capturar las sondas marcadoras con las sondas de captura. Sin embargo, la manipulación enzimática, en particular la amplificación de

ácidos nucleicos intermedios entre las sondas de captura y las sondas marcadoras, facilita la detección de las dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, se proporciona una pluralidad de las primeras sondas marcadoras y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Un primer polinucleótido amplificado se produce mediante amplificación por círculo rodador de un primer polinucleótido circular hibridado con la primera sonda de captura. El primer polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la primera sonda marcadora, y el primer polinucleótido amplificado comprende por tanto una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la primera sonda marcadora. La pluralidad de primeras sondas marcadoras hibrida a continuación con el primer polinucleótido amplificado. Del mismo modo, un segundo polinucleótido amplificado se produce mediante amplificación por círculo rodador de un segundo polinucleótido circular hibridado con la segunda sonda de captura (preferiblemente, al mismo tiempo, se produce el primer polinucleótido amplificado). El segundo polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda marcadora, y el segundo polinucleótido amplificado comprende por tanto una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda marcadora. La pluralidad de segundas sondas marcadoras hibrida a continuación con el segundo polinucleótido amplificado. Los polinucleótidos amplificados permanecen asociados (p. ej., de forma covalente) con la sonda o sondas de captura, y las sondas marcadoras son capturadas de este modo por las dianas de ácido nucleico. Se puede proporcionar un polinucleótido circular e hibridar con la sonda de captura, o se puede emplear un polinucleótido lineal que se circulariza mediante ligación después de que se una a la sonda de captura (p. ej., una sonda candado). Los mecanismos para la amplificación por círculo rodador, incluyendo la utilización de sondas candado, son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Larsson et al. (2004) "In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes" Nat Methods. 1(3):227-32, Nilsson et al. (1994) Science 265:2085-2088, y Antson et al. (2000) "PCR-generated padlock probes detect single nucleotide variation in genomic DNA" Nucl Acids Res 28(12):E58.

Las secuencias de la sonda de captura potenciales se examinan opcionalmente para determinar posibles interacciones con dianas de ácidos nucleicos no correspondientes, preamplificadores, amplificadores, marcas, sondas y/o secuencias genómicas cualesquiera relevantes, por ejemplo. Las secuencias que se espera que experimenten hibridación cruzada con ácidos nucleicos no deseados no se seleccionan típicamente para su uso en las sondas de captura. El examen puede ser, p. ej., visual (p. ej., examen visual de la complementariedad), computacional (p. ej., una búsqueda BLAST de la base de datos genómica relevante, o cálculo y comparación de las energías libres de unión), y/o experimental (p. ej., experimentos de hibridación cruzada). Las secuencias de la sonda marcadora se examinan preferentemente de manera similar, para ayudar a minimizar la hibridación cruzada no deseable potencial.

Una sonda de captura, preamplificador, amplificador, y/o sonda marcadora comprenden opcionalmente al menos un nucleótido no natural. Por ejemplo, una sonda de captura y un preamplificador (o amplificador o sonda marcadora) que hibrida con la misma opcionalmente comprenden, en posiciones complementarias, al menos un par de nucleótidos no naturales que experimentan emparejamiento de bases entre sí, pero que no experimentan emparejamiento de bases de Watson-Crick con las bases típicas de los ADN o ARN biológicos (es decir, A, C, G, T o U). Los ejemplos de los nucleótidos no naturales incluyen, pero sin limitación, nucleótidos Locked NucleicAcid™ (asequibles de Exiqon A/S, (www) exiqon.com;. véase, p. ej., SantaLucia Jr. (1998) Proc Natl Acad Sci 95: 1460-1465) e isoG, isoC, y otros nucleótidos utilizados en el sistema AEGIS (Artificially Expanded Genetic Information System, asequible de EraGen Biosciences, (www.) eragen.com; véanse, p. ej., los documentos USPN 6.001.983, USPN 6.037.120, y USPN 6.140.496). El uso de tales pares de bases no naturales (p. ej., pares de bases isoG-isoC) en las sondas pueden, por ejemplo., reducir el fondo y/o simplificar el diseño de la sonda mediante la disminución de la hibridación cruzada, o puede permitir el uso de sondas más cortas cuando los pares de bases no naturales tienen afinidades de unión más altas que las de los pares de bases naturales.

Como se ha señalado, los métodos son útiles para la detección múltiplex de ácidos nucleicos, incluyendo la detección simultánea de más de dos dianas de ácido nucleico. Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende una tercera diana de ácido nucleico, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca, en donde una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primeras y segundas señales, proporcionar al menos una tercera sonda de captura, hibridar en la célula la tercera sonda de captura con la tercera diana de ácido nucleico (cuando la tercera diana está presente en la célula), capturar la tercera sonda marcadora con la tercera sonda de captura, y detectar la tercera señal de la tercera marca. Se detectan simultáneamente de manera similar en la célula si se desea cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico.

Una diana de ácido nucleico puede ser esencialmente cualquier ácido nucleico que se detecta deseablemente en la célula. Por ejemplo, una diana de ácido nucleico puede ser un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico, o similares. El ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico endógeno para la célula. Como ejemplo adicional, la diana puede ser un ácido nucleico introducido o expresado en la célula por medio de infección de la célula con un patógeno, por ejemplo, un ARN o ADN genómico viral o bacteriano, un plásmido, un ARNm viral o bacteriano, o similares.

Las primera y segunda (y/u opcionales tercera, cuarta, etc.) dianas de ácido nucleico pueden ser parte de una única

molécula de ácido nucleico, o pueden ser moléculas separadas. Varias ventajas y aplicaciones de ambos enfoques se comentan con mayor detalle a continuación y en la sección titulada "Implementación, aplicaciones y ventajas". En una clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm. En otra clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera región de un ARNm y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda región del mismo ARNm; este enfoque puede aumentar la especificidad de la detección del ARNm. Alternativamente, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico. Las primera y segunda secuencias de polinucleótidos de ADN cromosómico se encuentran opcionalmente localizadas en el mismo cromosoma, p. ej., dentro del mismo gen, o en diferentes cromosomas.

En un aspecto, la señal o señales de la diana o dianas de ácido nucleico se normalizan. En una clase de realizaciones, la segunda diana de ácido nucleico comprende un ácido nucleico de referencia, y el método incluye la normalización de la primera señal a la segunda señal. El ácido nucleico de referencia es un ácido nucleico seleccionado como patrón de comparación. Resultará evidente que la elección del ácido nucleico de referencia puede depender de la aplicación deseada. Por ejemplo, para el análisis de la expresión génica, en donde la primera y opcionales tercera, cuarta, etc. dianas de ácido nucleico son ARNm cuyos niveles de expresión se van a determinar, el ácido nucleico de referencia puede ser un ARNm transcrito de un gen constitutivo. Como ejemplo adicional, la primera diana de ácido nucleico puede ser un ARNm cuya expresión está alterada en un estado patológico, p. ej., un ARNm expresado en una célula tumoral y no en una célula normal o expresado a un nivel más alto en una célula tumoral que en una célula normal, mientras que la segunda diana de ácido nucleico es un ARNm expresado a partir de un gen constitutivo o gen similar cuya expresión no se altera en el estado patológico. Como ejemplo adicional, la primera diana de ácido nucleico puede ser una secuencia de ADN cromosómico que se amplifica o se elimina en una célula tumoral, mientras que la segunda diana de ácido nucleico es otra secuencia de ADN cromosómico que se mantiene en su número normal de copias en la célula tumoral. En la presente memoria se describen ácidos nucleicos de referencia ilustrativos, y muchos más son bien conocidos en la técnica.

Opcionalmente, los resultados de la célula se comparan con los resultados de una célula de referencia. Es decir, las primera y segunda dianas también se detectan en una célula de referencia, por ejemplo, una célula no tumoral, no infectada, u otra célula normal sana, elegida como patrón de comparación dependiendo de la aplicación deseada. Las señales pueden ser normalizadas a un ácido nucleico de referencia como se señaló anteriormente. A modo de ejemplo, la primera diana de ácido nucleico puede ser el gen Her-2, con el objetivo de medir la amplificación del gen Her-2. La señal de Her-2 se puede normalizar a la de un gen de referencia, cuyo número de copias se mantiene de manera estable en el ADN genómico. La señal normalizada para el gen HER-2 de una célula diana (p. ej., una célula tumoral o una célula que se sospecha que es tumoral) se puede comparar con la señal normalizada de una célula de referencia (p. ej., una célula normal), para determinar el número de copias en la célula cancerosa en comparación con las células normales.

La marca (primera, segunda, tercera, etc.) puede ser esencialmente cualquier marca conveniente que proporcione directa o indirectamente una señal detectable. En un aspecto, la primera marca es una primera marca fluorescente y la segunda marca es una segunda marca fluorescente. La detección de la señal de las marcas comprende de este modo detectar las señales fluorescentes de las marcas. Se conoce una variedad de marcas fluorescentes cuyas señales se pueden distinguir entre sí, incluyendo, p. ej., fluoróforos y puntos cuánticos. En cuanto a otros ejemplos, la marca puede ser una marca luminiscente, una marca de dispersión de luz (p. ej., partículas de oro coloidal), o una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante).

Los métodos se pueden utilizar para detectar la presencia de las dianas de ácido nucleico en las células de esencialmente cualquier tipo de muestra. Por ejemplo, la muestra puede estar derivada de un fluido corporal, un residuo corporal, sangre, médula ósea, esputo, orina, ganglio linfático, heces, secreciones vaginales, citología cervical, hisopo oral u otro hisopo o frotis, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, líquido eyaculatorio, semen, fluido linfático, un fluido intercelular, un tejido (p. ej., un producto homogeneizado de tejido), una biopsia, y/o un tumor. La muestra y/o la célula pueden derivar de uno o más entre un ser humano, un animal, una planta, y una célula cultivada. Se pueden escrutar muestras derivadas de volúmenes incluso relativamente grandes de materiales tales como fluido corporal o residuo corporal en los métodos de la invención, y la eliminación de tales materiales es relativamente no invasiva. Las muestras se toman opcionalmente de un paciente, siguiendo los métodos de laboratorio convencionales después de consentimiento informado.

Los métodos para la detección de dianas de ácido nucleico en las células se pueden utilizar para identificar las células. Por ejemplo, se puede identificar que una célula es de un tipo deseado basándose en los ácidos nucleicos, y en qué niveles los contiene. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, los métodos incluyen la identificación de la célula como una célula diana deseada basándose en la detección de las primeras y segundas señales (y opcionales tercera, cuarta, etc. señales) dentro de la célula. La célula se puede identificar basándose en la presencia o ausencia de una o más de las dianas de ácido nucleico. Del mismo modo, la célula se puede identificar basándose en la fuerza relativa de la señal o el nivel de expresión de una o más de las dianas de ácido nucleico. Las señales se normalizan opcionalmente como se indicó anteriormente y/o se comparan con las de una célula de referencia.

Los métodos pueden aplicarse a la detección y la identificación incluso de tipos de células raras. De este modo, la

muestra que incluye la célula puede ser una mezcla de células diana deseadas y otras células, que no son diana, que pueden estar presentes en exceso de las células diana. Por ejemplo, la razón de las células diana con respecto a las células de todos los otros tipos en la muestra es opcionalmente menor de $1:1x10^4$, menor de $1:1x10^5$, menor de $1:1x10^6$, menor de $1:1x10^7$, menor de $1:1x10^8$, o incluso menor de $1:1x10^9$.

Esencialmente, se puede detectar e identificar cualquier tipo de célula que pueda diferenciarse dependiendo de su contenido de ácido nucleico (presencia, ausencia, nivel de expresión o número de copias de uno o más ácidos nucleicos) utilizando los métodos y una elección adecuada de las dianas de ácido nucleico. A modo de unos pocos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral circulante, una célula infectada viralmente, una célula fetal en sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (p. ej., sangre u otro fluido corporal), una célula endotelial, células endoteliales precursoras, o células del miocardio en la sangre, una célula madre, o una célula T. Los tipos de células raras pueden ser enriquecidos antes de realizar los métodos, si fuera necesario, por medio de métodos conocidos en la técnica (p. ej., la lisis de glóbulos rojos de la sangre, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, enriquecimiento adicional de las células diana raras mediante separación magnética de células activadas (MACS), etc.). Los métodos se combinan opcionalmente con otras técnicas, tales como la tinción DAPI para el ADN nuclear. Resultará evidente que se detecta opcionalmente simultáneamente una variedad de diferentes tipos de marcadores de ácido nucleico por medio de los métodos y se utiliza para identificar la célula. Por ejemplo, se puede identificar una célula basándose en la presencia o nivel relativo de expresión de una diana de ácido nucleico en la célula y la ausencia de otra diana de ácido nucleico de la célula; por ejemplo, se puede identificar una célula tumoral circulante por la presencia o el nivel de uno o más marcadores que se encuentran en la célula tumoral y no se encuentran (o se encuentran a diferentes niveles) en las células de la sangre, y su identidad se puede confirmar por la ausencia de uno o más marcadores presentes en las células de la sangre y no en células tumorales circulantes. El principio puede ser extendido al uso de cualquier otro tipo de marcadores tales como marcadores basados en proteínas en células individuales.

La célula se fija y permeabiliza antes de la hibridación de las sondas de captura, para retener las dianas de ácido nucleico en la célula y permitir que las sondas de captura, sondas marcadoras, etc., entren en la célula. La célula se lava opcionalmente para eliminar los materiales no capturados por una de las dianas de ácido nucleico. La célula se puede lavar después de cualquiera de las diversas etapas, por ejemplo, después de la hibridación de las sondas de captura con las dianas de ácido nucleico para eliminar las sondas de captura no unidas, después de la hibridación de los preamplificadores, los amplificadores, y/o las sondas marcadoras con las sondas de captura, y/o similares.

Las diversas etapas de captura y de hibridación se pueden realizar de forma simultánea o sucesivamente, esencialmente en cualquier orden conveniente. Preferiblemente, se lleva a cabo una etapa de hibridación dada para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo. Por ejemplo, todas las sondas de captura (primera, segunda, etc.) se pueden añadir a la célula a la vez y permitir que hibriden con sus correspondientes dianas, la célula se puede lavar, los amplificadores (primero, segundo, etc.) se pueden hibridar con las sondas de captura correspondientes, la célula se puede lavar, las sondas marcadoras (primera, segunda, etc.) se pueden hibridar con los amplificadores correspondientes, y la célula se puede lavar a continuación de nuevo antes de la detección de las marcas. Como ejemplo adicional, las sondas de captura pueden hibridar con las dianas, la célula se puede lavar, los amplificadores y las sondas marcadoras se pueden añadir juntos e hibridar, y la célula se puede lavar a continuación antes de la detección. Resultará evidente que la diana o las dianas de ácido nucleico de doble hebra se desnaturalizan preferiblemente, p. ej., con calor, antes de la hibridación de la sonda o las sondas de captura correspondientes a la diana o las dianas.

Preferiblemente, la célula está en suspensión durante todas o la mayoría de las etapas del método, para facilitar su manejo. Sin embargo, los métodos son también aplicables a las células en muestras sólidas de tejidos (p. ej., secciones de tejido) y/o células inmovilizadas sobre un sustrato (p. ej., un porta u otra superficie). Por lo tanto, en una clase de realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o la célula está en suspensión durante las etapas de hibridación, de captura y/o de detección. Por ejemplo, la célula puede estar en suspensión en la muestra y durante las etapas de hibridación, de captura, de lavado opcional, y de detección. En otras realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula, y la célula se fija sobre un sustrato durante las etapas de hibridación, de captura y/o de detección. Por ejemplo, la célula puede estar en suspensión durante las etapas de hibridación, de captura, y de lavado opcionales e inmovilizada sobre un sustrato durante la etapa de detección.

Las señales procedentes de las marcas pueden ser detectadas, y sus intensidades medidas opcionalmente, por medio de cualquiera de una variedad de mecanismos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en realizaciones en que la célula está en suspensión, las primera y segunda (y tercera opcional, etc.) señales se pueden detectar convenientemente mediante citometría de flujo. En realizaciones en que las células se inmovilizan sobre un sustrato, las primera y segunda (y tercera opcional etc.) señales se pueden detectar, p. ej., mediante un escáner láser o un microscopio, p. ej., un microscopio de barrido fluorescente o automático. Como se ha señalado, la detección es a nivel de una sola célula individual. Las señales procedentes de las marcas se detectan típicamente en una sola operación (p. ej., una sola ronda de citometría de flujo o una única sesión de microscopía o barrido), en lugar de sucesivamente en operaciones separadas para cada marca. Tal operación de detección única puede, por ejemplo, implicar el cambio de filtros ópticos entre la detección de las diferentes marcas, pero no implica la detección de la primera marca seguida de la captura de la segunda marca y a continuación detección de la segunda marca. En

algunas realizaciones, las primera y segunda (y tercera opcional etc.) marcas son capturadas por sus respectivas dianas simultáneamente, pero se detectan en etapas u operaciones de detección separadas.

Las características adicionales descritas en la presente memoria, p. ej., en la sección de más abajo titulada "Implementación, aplicaciones y ventajas", se puede aplicar a los métodos, según corresponda. Por ejemplo, como se describe en mayor detalle a continuación, una sonda marcadora puede incluir más de una marca, idéntica o distinta. La intensidad de la señal se ajusta opcionalmente entre las dianas dependiendo de su número de copias esperado, si se desea; por ejemplo, la señal para un ARNm expresado a bajos niveles puede ser amplificada en un grado mayor (p. ej., mediante el uso de más marcas por sonda marcadora y/o el uso de preamplificadores y amplificadores para capturar más sondas marcadoras por copia de la diana) que la señal para un ARNm altamente expresado.

En otro aspecto de la invención, dos o más ácidos nucleicos se detectan mediante amplificación por PCR de los ácidos nucleicos in situ en las células individuales. Para evitar la fuga de los amplicones resultantes de las células, se puede elaborar una emulsión de agua-aceite como mencionan Li et al. (2006) "BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants" Nature Methods 3(2):95-7 que separa células individuales en diferentes compartimentos.

Detección de niveles relativos mediante normalización a ácidos nucleicos de referencia

Como se ha expuesto brevemente más arriba, la señal detectada para un ácido nucleico de interés se puede normalizar a la de un ácido nucleico de referencia, convencional. Por lo tanto, en la presente memoria se describen métodos para someter a ensayo un nivel relativo de uno o más ácidos nucleicos diana en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende o se sospecha que comprende un primer ácido nucleico diana, y comprende un segundo ácido nucleico de referencia. También se proporcionan una primera sonda marcadora que comprende una primera marca y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. En la célula, la primera sonda marcadora se captura con el primer ácido nucleico diana (cuando el primer ácido nucleico diana está presente en la célula) y la segunda sonda marcadora se captura con el segundo ácido nucleico de referencia. La primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca se detectan a continuación en la célula individual, y se mide la intensidad de cada señal. La intensidad de la primera señal es normalizada a la intensidad de la segunda señal (referencia). De este modo se somete a ensayo el nivel del primer ácido nucleico diana con respecto al nivel del segundo ácido nucleico de referencia en la célula, ya que las primera y segunda marcas están asociadas con sus respectivos ácidos nucleicos. Los métodos son opcionalmente cuantitativos, permitiendo la medición de la cantidad del primer ácido nucleico diana con respecto a la cantidad del segundo ácido nucleico de referencia en la célula. Por lo tanto, la intensidad de la primera señal normalizada a la de la segunda señal se puede correlacionar con una cantidad del primer ácido nucleico diana presente en la célula.

Las sondas marcadoras se pueden unir directamente a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, la primera sonda marcadora puede hibridar con el primer ácido nucleico diana y/o la segunda sonda marcadora puede hibridar con el segundo ácido nucleico de referencia. Alternativamente, algunas o todas las sondas marcadoras se pueden unir indirectamente a sus ácidos nucleicos correspondientes, p. ej., a través de sondas de captura. Por ejemplo, las primera y segunda sondas marcadoras se pueden unir directamente a los ácidos nucleicos, o se puede unir una directamente mientras que la otra se une indirectamente, o ambas se pueden unir indirectamente.

Las sondas marcadoras son capturadas opcionalmente con los ácidos nucleicos a través de sondas de captura. En este caso, se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura. En la célula, la primera sonda de captura hibrida con el primer ácido nucleico diana y la segunda sonda de captura hibrida con el segundo ácido nucleico de referencia. La primera sonda marcadora es capturada con la primera sonda de captura y la segunda sonda marcadora es capturada con la segunda sonda de captura, capturando de este modo la primera sonda marcadora con el primer ácido nucleico diana y la segunda sonda marcadora con el segundo ácido nucleico de referencia. Las características descritas para los métodos anteriores se aplican también a estos métodos, con respecto a la configuración y al número de sondas de marcadoras y de captura, al uso opcional de preamplificadores y/o amplificadores, a la amplificación por círculo rodador de polinucleótidos circulares, y similares.

Los métodos se pueden utilizar para la detección múltiplex de ácidos nucleicos, incluyendo la detección simultánea de dos o más ácidos nucleicos diana. Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende un tercer ácido nucleico diana, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca, en donde una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primeras y segundas señales; capturar, en la célula, la tercera sonda marcadora con el tercer ácido nucleico diana (cuando está presente en la célula); detectar la tercera señal de la tercera marca, cuya detección comprende medir una intensidad de la tercera señal; y normalizar la intensidad de la tercera señal a la intensidad de la segunda señal. Alternativamente, la tercera señal se puede normalizar a la de un ácido nucleico de referencia diferente. Los cuarto, quinto, sexto, etc. ácidos nucleicos se detectan simultáneamente de manera similar en la célula si se desea. Las tercera, cuarta, quinta, etc. sondas marcadoras hibridan opcionalmente directamente con su ácido nucleico correspondiente, o pueden ser capturadas indirectamente mediante sondas de captura como se describe para la

primera y segunda sondas marcadoras.

Los métodos se pueden utilizar para el análisis de la expresión génica, la detección de la amplificación o supresión génica, o la detección o el diagnóstico de enfermedades, solo como algunos ejemplos. Un ácido nucleico diana puede ser esencialmente cualquier ácido nucleico que se detecta deseablemente en la célula. Por ejemplo, un ácido nucleico diana puede ser un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico, o similares. El ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico endógeno a la célula, o como otro ejemplo, la diana puede ser un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno, p. ej., un ARN o ADN genómico viral o bacteriano, un plásmido, un ARNm viral o bacteriano, o similares. El ácido nucleico de referencia puede ser de una manera similar un ADN, un ARNm, un ADN cromosómico, un ARNm, un ARN endógeno a la célula, o similares.

Como se describió anteriormente, la elección del ácido nucleico de referencia puede depender de la aplicación deseada. Por ejemplo, para el análisis de la expresión génica, en donde el primer y opcionales tercero, cuarto, etc. ácidos nucleicos diana son ARNm cuyos niveles de expresión se van a determinar, el ácido nucleico de referencia puede ser un ARNm transcrito de un gen constitutivo. Como ejemplo adicional, el primer ácido nucleico diana puede ser un ARNm cuya expresión está alterada en un estado patológico, p. ej., un ARNm expresado en una célula tumoral y no una célula normal o expresado a un nivel más alto en una célula tumoral que en una célula normal, mientras que el ácido nucleico de referencia es un ARNm expresado a partir de un gen constitutivo o gen similar cuya expresión no se altera en el estado patológico. En un ejemplo similar, el ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico viral o bacteriano, mientras que el ácido nucleico de referencia es endógeno a la célula. Como ejemplo adicional, el primer ácido nucleico diana puede ser una secuencia de ADN cromosómico que se amplifica o se elimina en una célula tumoral, mientras que el ácido nucleico de referencia es otra secuencia de ADN cromosómico que se mantiene en su número normal de copias en la célula tumoral. Los ácidos nucleicos de referencia ilustrativos se describen en la presente memoria, y muchos más son bien conocidos en la técnica.

En una clase de realizaciones, el primer ácido nucleico diana es un primer ARNm y el segundo ácido nucleico de referencia es un segundo ARNm. En otra clase de realizaciones, el primer ácido nucleico diana comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y el segundo ácido nucleico de referencia comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico. Las primera y segunda secuencias de polinucleótidos de ADN cromosómico están situadas opcionalmente en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes.

Opcionalmente, los resultados normalizados de la célula se comparan con los resultados normalizados de una célula de referencia. Es decir, los ácidos nucleicos diana y de referencia también se detectan en una célula de referencia, por ejemplo, una célula no tumoral, no infectada, u otra célula normal sana, elegida como patrón de comparación dependiendo de la aplicación deseada. A modo de ejemplo, el primer ácido nucleico diana puede ser el gen Her-2, con el objetivo de medir la amplificación de genes Her-2. La señal de Her-2 se puede normalizar a la de un gen de referencia cuyo número de copias se mantiene de manera estable en el ADN genómico. La señal normalizada para el gen Her-2 de una célula diana (p. ej., una célula tumoral o que se sospecha que es una célula tumoral) se puede comparar con la señal normalizada de una célula de referencia (p. ej., una célula normal), para determinar el número de copias en la célula cancerosa en comparación con las células normales.

La intensidad de la señal se ajusta opcionalmente entre la diana y los ácidos nucleicos de referencia dependiendo de su número de copias esperado, si se desea. Por ejemplo, la señal para un ARNm diana expresado a bajos niveles se puede amplificar en un grado mayor (p. ej., mediante el uso de más marcas por sonda marcadora y/o el uso de sondas de captura, preamplificadores y amplificadores para capturar más sondas marcadoras por copia de la diana) que la señal para un ARNm altamente expresado (que se puede detectar, p. ej., mediante unión directa de la sonda marcadora al ácido nucleico de referencia, mediante el uso de sondas de captura y amplificador sin un preamplificador, o similares).

Los métodos para someter a ensayo los niveles relativos de ácidos nucleicos diana en las células se pueden utilizar para identificar las células. Por ejemplo, se puede identificar que una célula es de un tipo deseado basándose en qué ácidos nucleicos contiene, y a qué niveles. De este modo, en una clase de realizaciones, los métodos incluyen la identificación de la célula como una célula diana deseada basándose en la primera señal normalizada (y opcionales tercera, cuarta, etc. señales normalizadas). Como se describe en la presente memoria, la célula se puede identificar basándose en la presencia o ausencia de uno o más de los ácidos nucleicos diana. Del mismo modo, la célula se puede identificar basándose en la fuerza relativa de la señal o el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos diana. Las señales se comparan opcionalmente con las de una célula de referencia.

Los métodos pueden aplicarse a la detección y la identificación incluso de tipos de células raras. De este modo, la muestra que incluye la célula puede ser una mezcla de células diana deseadas y otras células, que no son diana, que pueden estar presentes en exceso de las células diana. Por ejemplo, la razón de las células diana con respecto a las células de todos los otros tipos en la muestra es opcionalmente menor de $1:1x10^4$, menor de $1:1x10^5$, menor de $1:1x10^6$, menor de $1:1x10^7$, menor de $1:1x10^8$, o incluso menor de $1:1x10^9$.

Esencialmente, se puede detectar e identificar cualquier tipo de célula que puede diferenciarse dependiendo de su

contenido de ácido nucleico (presencia, ausencia, o número de copias de uno o más ácidos nucleicos) utilizando los métodos y una elección adecuada de ácidos nucleicos diana y de referencia. A modo de unos pocos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral circulante, una célula infectada viralmente, una célula fetal en sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (por ejemplo, sangre u otro fluido corporal), o una célula endotelial, célula endotelial precursora o células del miocardio en la sangre. Los tipos de células raras pueden ser enriquecidos antes de realizar los métodos, si fuera necesario, por medio de métodos conocidos en la técnica (p. ej., lisis de glóbulos rojos, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, etc.). Los métodos se combinan opcionalmente con otras técnicas, tales como la tinción DAPI para el ADN nuclear. Resultará evidente que se detecta opcionalmente simultáneamente una variedad de diferentes tipos de marcadores de ácido nucleico mediante los métodos y se utiliza para identificar la célula. Por ejemplo, una célula se puede identificar basándose en la presencia o el nivel de expresión relativa de un ácido nucleico diana en la célula y la ausencia de otra diana de ácido nucleico de la célula; p. ej., una célula tumoral circulante se puede identificar por la presencia o el nivel de uno o más marcadores que se encuentran en la célula tumoral y que no se encuentran (o que se encuentran a diferentes niveles) en células de la sangre, y por la ausencia de uno o más marcadores presentes en las células de la sangre y no en células tumorales circulantes. El principio puede ser extendido al uso de cualquier otro tipo de marcadores tales como marcadores basados en proteínas en las células individuales.

Esencialmente todas las características señaladas por los métodos anteriores se aplican también a estas realizaciones, según sea relevante; por ejemplo, con respecto a la fuente de la muestra, la fijación y permeabilización de la célula, el lavado de la célula, la desnaturalización de los ácidos nucleicos diana y de referencia de doble hebra, el tipo de marcas, el uso de sondas de bloqueo opcionales, la detección de señales, la detección (e intensidad medición) mediante citometría de flujo o microscopía, la presencia de la célula en suspensión o inmovilizada sobre un sustrato, y/o similares. Además, las características adicionales descritas en la presente memoria, p. ej., en la sección titulada "Implementación, aplicaciones y ventajas", se pueden aplicar a los métodos, según corresponda.

Los métodos de la invención se pueden utilizar para el análisis de la expresión génica en células individuales. Actualmente, el análisis de la expresión génica se ocupa de poblaciones celulares heterogéneas tales como sangre o especímenes tumorales. La sangre contiene diversos subtipos de leucocitos, y cuando se miden los cambios en la expresión génica de sangre completa o de ARN aislado de la sangre, no se sabe qué subtipo de células de la sangre cambia realmente su expresión génica. Es posible que la expresión del gen de solo un cierto subtipo de células de la sangre se vea afectada en un estado de enfermedad o por tratamiento con fármacos, por ejemplo. La tecnología que puede medir la expresión génica en células individuales, de modo que se puedan examinar los cambios de expresión génica en células individuales, es por lo tanto deseable. Del mismo modo, un espécimen tumoral contiene una población heterogénea de células incluyendo células tumorales, células normales, células estromales, células inmunitarias, etc. La tecnología actual examina la suma de la expresión de todas esas células a través del ARN total o el producto lisado celular. Sin embargo, el cambio de expresión en general puede no ser representativo del de las células tumorales diana. Así que de nuevo, sería útil analizar los cambios de expresión en células individuales de manera que las células tumorales diana se pudieran examinar específicamente, para ver cómo cambia la expresión génica en las células diana y cómo responden al tratamiento farmacológico, por ejemplo.

En un aspecto, la presente invención permite realizar el análisis de la expresión génica en células individuales. El análisis de la expresión génica de las células individuales se puede llevar a cabo midiendo la expresión de un gen diana y normalizándola frente a la expresión de un gen constitutivo, como se describió anteriormente. A modo solo de un par de ejemplos, la expresión normalizada en un estado de enfermedad se puede comparar con el del estado normal, o la expresión en un estado tratado con fármaco se puede comparar con el del estado normal. El cambio de nivel de expresión en células individuales puede tener importancia biológica que indica progresión de la enfermedad, eficacia terapéutica y/o toxicidad del fármaco, estadificación y clasificación del tumor, etc.

En los métodos para realizar el análisis de la expresión génica comparativa en células individuales, se proporciona una primera población celular mixta que comprende una o más células de un tipo especificado. También se proporciona una segunda población celular mixta que comprende una o más células del tipo especificado. Se mide un nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos diana con respecto a un ácido nucleico de referencia en las células del tipo especificado de la primera población, para proporcionar un primer perfil de expresión. Se mide un nivel de expresión de los uno o más ácidos nucleicos diana con respecto al ácido nucleico de referencia en las células del tipo especificado de la segunda población, para proporcionar un segundo perfil de expresión. Se comparan los primeros y segundos perfiles de expresión.

En una clase de realizaciones, los uno o más ácidos nucleicos diana son uno o más ARNm, p. ej., dos o más, tres o más, cuatro o más, etc. ARNm. El nivel de expresión de cada ARNm se puede determinar con respecto al de un gen constitutivo cuyo ARNm sirve como ácido nucleico de referencia.

Las primera y/o segunda poblaciones celulares mixtas contienen al menos otro tipo de célula además del tipo especificado, más típicamente al menos otros dos o más tipos de células, y opcionalmente de varios a muchos otros tipos de células (p. ej., como se encuentra en sangre completa, tumor, u otra muestra biológica compleja). La proporción de células del tipo especificado con respecto a las células de todos los otros tipos en la primera o segunda población celular mixta es opcionalmente menor de $1:1x10^4$, menor de $1:1x10^5$, menor de $1:1x10^6$, menor

de 1:1x10^7, menor de 1:1x10^8, o incluso menor de 1:1x10^9.

Como resultará evidente, un cambio en el perfil de expresión génica entre las dos poblaciones puede indicar un estado o progreso de la enfermedad, una respuesta a fármacos, una eficacia terapéutica, etc. De este modo, p. ej., la primera población celular mixta puede ser de un paciente que ha sido diagnosticado o que va a ser diagnosticado de una enfermedad o trastorno concretos, mientras que la segunda población mixta es de un individuo sano. Del mismo modo, las primera y segunda poblaciones mixtas pueden ser de un solo individuo, pero tomadas en diferentes momentos, por ejemplo, para seguir el progreso de la enfermedad o para evaluar la respuesta al tratamiento farmacológico. Por consiguiente, la primera población celular mixta puede ser tomada de un individuo (p. ej., un ser humano) antes de que se inicie el tratamiento con un fármaco u otro compuesto, mientras que la segunda población se toma en un momento especificado después de que se inicie el tratamiento. Como ejemplo adicional, la primera población mixta puede ser de un individuo tratado, mientras que la segunda población mixta es de un individuo no tratado.

Esencialmente se aplican también todas las características señaladas para los métodos anteriores a estas realizaciones, según corresponda; por ejemplo, con respecto al tipo de ácidos nucleicos diana y de referencia, el tipo de célula, la fuente de la muestra, la fijación y permeabilización de la célula, el lavado de la célula, la desnaturalización de los ácidos nucleicos diana y de referencia de doble hebra, el tipo de marcas, el uso y la configuración de las sondas marcadoras, las sondas de captura, los preamplificadores y/o los amplificadores, el uso de sondas de bloqueo opcionales, la detección de señales, la detección (y la medición de la intensidad) mediante citometría de flujo o microscopía, la presencia de la célula en suspensión o inmovilizada sobre un sustrato, y/o similares. Los ácidos nucleicos diana y de referencia ilustrativos se describen en la presente memoria.

En otro aspecto, los métodos se pueden utilizar para comparar el número de copias en las células individuales de una primera población (p. ej., células tumorales) con el número de copias en las células individuales de una segunda población (p. ej., células normales utilizadas como referencia). La diana o las dianas de ácido nucleico pueden ser transcritos o ADN genómico, donde, por ejemplo, el grado de amplificación o deleción de genes tales como Her-2 se puede correlacionar con el progreso del tumor. En otro aspecto, los métodos se pueden aplicar al análisis de la expresión génica en células individuales, incluso en una única población, incluyendo, p. ej., las células del mismo tipo pero en diferentes etapas del ciclo celular.

Densidad de la marca

Los métodos de la invención permiten la captura de muchas más marcas con pequeñas regiones de ácidos nucleicos diana de lo que lo hacen las técnicas actualmente existentes. Por ejemplo, las técnicas FISH convencionales utilizan típicamente sondas que cubren 20 kb o más, y una sonda tiene típicamente fluoróforos conjugados químicamente a una densidad de aproximadamente una molécula fluorescente por siete nucleótidos de la sonda. Cuando se emplea la detección de dianas con baliza moleculares, un par de marcas se captura con la diana en la región cubierta por la baliza, típicamente aproximadamente 40 nucleótidos. Para una discusión adicional de las técnicas actuales ilustrativas, véanse, p. ej., las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos Núms. 2004/0091880 y 2005/0181463, el documento USPN 6.645.731, y las publicaciones de solicitud de patente internacional Núms. WO 95/09245 y 03/019141.

Los métodos descritos en la presente memoria, en comparación, permiten fácilmente la captura de cientos de marcas (por ejemplo, 400 o más) por la región de la diana cubierta por una única sonda de captura, p. ej., 20-25 nucleótidos o más. El grado teórico de amplificación obtenido a partir de una única sonda de captura se calcula fácilmente para cualquier configuración dada de sondas de captura, amplificadores, etc.; por ejemplo, el grado teórico de amplificación logrado a partir de una única sonda de captura, y por lo tanto el número de marcas por longitud en nucleótidos de la sonda de captura, puede ser igual al número de preamplificadores unidos a la sonda de captura x número de amplificadores que se unen a cada preamplificador x número de sondas marcadoras que se unen a cada preamplificador x número de marcas por sonda marcadora.

Por lo tanto, en un aspecto la invención proporciona métodos que facilitan la asociación de una alta densidad de marcas a ácidos nucleicos diana en las células. Una clase general de realizaciones proporciona métodos de detección de dos o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende o se sospecha que comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. En la célula, una primera marca se captura con la primera diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula) y una segunda marca se captura con la segunda diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula). Una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. Como se ha señalado, las marcas son capturadas a alta densidad. Por lo tanto, se captura con la primera diana de ácido nucleico un promedio de al menos una copia de la primera marca por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y se captura con la segunda diana de ácido nucleico un promedio de al menos una copia de la segunda marca por nucleótido del segundo ácido nucleico diana sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico. Se detectan la primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca.

En una clase de realizaciones, se capturan un promedio de al menos cuatro, ocho, o doce copias de la primera marca por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico con la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y se capturan un promedio de al menos cuatro, ocho, o doce copias de la segunda marca por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico con la segunda diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico. En una realización, se capturan un promedio de al menos dieciséis copias de la primera marca por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico con la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y se capturan un promedio de al menos dieciséis copias de la segunda marca por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico con la segunda diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico.

Esencialmente todas las características observadas para los métodos anteriores también se aplican a estas realizaciones, según corresponda, por ejemplo, con respecto al tipo de marcas, la detección de señales, el tipo, el tratamiento, y la suspensión de la célula, y/o similares. Las regiones de las primera y segunda dianas de ácido nucleico opcionalmente abarcan al menos 25, 50, 100, 200, o más nucleótidos contiguos y/o a lo sumo 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, o menos nucleótidos. Una densidad parecida de terceras, cuartas, quintas, sextas, etc. marcas está presente opcionalmente para (por ejemplo, capturadas por), las terceras, cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico.

Detección de células diana

Como se describió anteriormente, las células se pueden detectar e identificar mediante la detección de sus ácidos nucleicos constituyentes. Para ciertas aplicaciones, por ejemplo, es ventajosa la detección de células raras de grandes mezclas heterogéneas de células, la detección de múltiples marcadores de ácido nucleico redundantes, con el fin de detectar la célula rara. El siguiente ejemplo hipotético ilustra una ventaja de detectar marcadores redundantes.

Se dice que las células tumorales circulantes (CTC) se van a detectar a partir de una muestra de sangre en la que la concentración de CTC es una en 10^6 glóbulos blancos normales. Si un solo marcador de ácido nucleico para la CTC (p. ej., un ácido nucleico cuya presencia o número de copias pueden distinguir unívocamente y suficientemente la célula del resto de la población celular) tiene una especificidad de detección de 1 en 10^3, 1000 células serán identificados por error como "CTC" cuando se cuentan 10^6 células. (Tales falsos positivos pueden resultar de la señal de fondo aleatoria generado por la unión no específica de la sonda o sondas relevantes o de factores similares). Si está incluido un marcador independiente adicional que, por sí mismo, también tiene una especificidad de detección de 1 en 10^3, y si una célula se identifica como CTC solo si ambos marcadores son positivos, la especificidad de detección combinada se incrementa ahora drásticamente, a 1 en $10^3 x 10^3 = 10^6$. Esta especificidad es suficiente para la detección directa de CTC en los glóbulos blancos normales bajo estos supuestos. Del mismo modo, si se utilizan tres marcadores redundantes independientes para la identificación de CTC, la especificidad de detección se puede reforzar a 1 en 10^9. El uso de dos o más marcadores redundantes reduce de este modo el número de falsos positivos y facilita la detección incluso de células raras a partir de muestras complejas.

Por consiguiente, los métodos de la invención permiten la detección de una célula individual de un tipo especificado. Para esto, se proporciona una muestra que comprende una mezcla de tipos de células incluyendo al menos una célula del tipo especificado. Se proporcionan Una primera sonda marcadora que comprende una primera marca y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. En la célula, la primera sonda marcadora se captura con una primera diana de ácido nucleico (cuando la primera diana de ácido nucleico está presente en la célula) y la segunda sonda marcadora se captura con una segunda diana de ácido nucleico (cuando la segunda diana de ácido nucleico está presente en la célula). La primera señal de la primera marca y la segunda señal de la segunda marca se detectan y se correlacionan con la presencia, ausencia o cantidad de las correspondientes, primera y segunda dianas de ácido nucleico en la célula. Se identifica que la célula es del tipo especificado basándose en la detección de la presencia, ausencia o cantidad (p. ej., una cantidad distinta de cero) de la primera y la segunda dianas de ácido nucleico dentro de la célula, donde el tipo especificado de célula es distinguible de los otros tipos de células en la mezcla basándose en la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico o la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula (es decir, las dianas de ácido nucleico son marcadores redundantes para el tipo de célula especificado). Opcionalmente se miden la intensidad de la primera señal y la intensidad de la segunda señal y se correlacionan con la cantidad de ácido nucleico correspondiente presente en la célula.

Cada diana de ácido nucleico que sirve como marcador para el tipo de célula especificado puede distinguir el tipo de célula por su presencia en la célula, por su cantidad (número de copias, p. ej., su número de copias genómicas o su nivel de expresión de transcritos), o por su ausencia de la célula (un marcador negativo). Un conjunto de dianas de ácido nucleico puede incluir diferentes tipos de tales marcadores; es decir, una diana de ácido nucleico puede servir como marcador positivo, distinguiendo la célula por su presencia o cantidad distinta de cero en la célula, mientras que otro sirve como marcador negativo, distinguiendo la célula por su ausencia en la célula. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, la célula comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido

nucleico, y se identifica que la célula es del tipo especificado basándose en la detección de la presencia o la cantidad tanto de la primera como de la segunda dianas de ácido nucleico dentro de la célula, donde el tipo especificado de célula es distinguible de los otros tipos de células en la mezcla basándose en la presencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico o la presencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

Las sondas marcadoras pueden unirse directamente a las dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera sonda marcadora puede hibridar con la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda sonda marcadora puede hibridar con la segunda diana de ácido nucleico. Alternativamente, algunas o todas las sondas marcadoras se pueden unir indirectamente a sus dianas de ácido nucleico correspondientes, p. ej., a través de sondas de captura. Por ejemplo, las primera y segunda sondas marcadoras se pueden unir directamente a las dianas de ácido nucleico, o una se puede unir directamente mientras que la otra se une indirectamente, o ambas se pueden unir indirectamente.

Según la invención, las sondas marcadoras son capturadas con las dianas de ácido nucleico a través de sondas de captura. En una clase de realizaciones, se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura. En la célula, la primera sonda de captura hibrida con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda de captura hibrida con la segunda diana de ácido nucleico. La primera sonda marcadora es capturada con la primera sonda de captura y la segunda sonda marcadora es capturada con la segunda sonda de captura, capturando de este modo la primera sonda marcadora con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda marcadora con la segunda diana de ácido nucleico. Las características descritas para los métodos anteriores también se aplican a estas realizaciones, con respecto a la configuración y al número de sondas marcadoras y de captura, el uso opcional de preamplificadores y/o amplificadores, la amplificación por círculo rodador de polinucleótidos circulares, y similares.

Las tercera, cuarta, quinta, etc. dianas de ácido nucleico se detectan opcionalmente en la célula. Por ejemplo, el método incluye opcionalmente: proporcionar una tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca, en donde una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primeras y segundas señales, capturar en la célula la tercera sonda marcadora con un tercer ácido nucleico diana (cuando está presente en la célula), y detectar la tercera señal de la tercera marca. Las tercera, cuarta, quinta, etc. sondas marcadoras hibridan opcionalmente directamente con su ácido nucleico correspondiente, o puede ser capturadas indirectamente a través de sondas de captura como se describe para la primera y segunda sondas marcadoras.

Se pueden utilizar marcadores adicionales en cualquiera de una variedad de maneras. Por ejemplo, la célula puede comprender la tercera diana de ácido nucleico, y las primera y/o segunda señales pueden ser normalizadas a la tercera señal. Los métodos pueden incluir la identificación de que la célula es del tipo especificado basándose en las primera y/o segunda señales normalizadas, p. ej., en realizaciones en que el tipo de célula diana es distinguible de los otros tipos de células en la mezcla basándose en el número de copias las primera y/o segunda dianas de ácido nucleico, en lugar de solamente en su presencia en el tipo de célula diana y no en los otros tipos de células. Los ejemplos incluyen las células detectables basándose en un patrón de expresión génica diferencial, CTC u otras células tumorales detectables por la expresión en exceso de uno o más ARNm específicos, y CTC u otras células tumorales detectables mediante amplificación o deleción de una o más regiones cromosómicas específicas.

Como ejemplo adicional, la tercera diana de ácido nucleico puede servir como un tercer marcador redundante para el tipo de célula diana, p. ej., para mejorar la especificidad del análisis para determinar el tipo de célula deseado. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, los métodos incluyen la correlación de la tercera señal detectada a partir de la célula con la presencia, ausencia o cantidad de la tercera diana de ácido nucleico en la célula, y la identificación de que la célula es del tipo especificado basándose en la detección de la presencia, ausencia, o cantidad de las primera, segunda y tercera dianas de ácido nucleico, dentro de la célula, en donde el tipo especificado de célula es distinguible de los otros tipos de células en la mezcla basándose en la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico, la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico, o la presencia, ausencia o cantidad de la tercera diana de ácido nucleico en la célula.

Como otro ejemplo adicional, los marcadores adicionales pueden ayudar a identificar el tipo de célula. Por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de los primeros y terceros marcadores puede ser suficiente para identificar el tipo de células, al igual que la presencia, ausencia o cantidad de los segundos y cuartos marcadores; los cuatro marcadores podrían ser detectados para proporcionar dos conjuntos redundantes de marcadores y por lo tanto una mayor especificidad de detección. Como ejemplo adicional, se pueden utilizar uno o más marcadores adicionales en la selección negativa contra los tipos celulares no deseados; por ejemplo, la identidad de una célula como una CTC puede ser verificada adicionalmente por la ausencia de la célula de uno o más marcadores presentes en las células de la sangre y no en células tumorales circulantes.

La detección de dianas de ácido nucleico adicionales también puede proporcionar una información adicional útil en el diagnóstico, la predicción de resultados o similares, independientemente de si las dianas sirven como marcadores para el tipo de célula concreto. Por ejemplo, las dianas de ácido nucleico adicionales pueden incluir marcadores del potencial de proliferación, la apoptosis, u otros cambios metastásicos, genéticos, o epigenéticos.

Las señales de las dianas adicionales se normalizan opcionalmente a un ácido nucleico de referencia como se ha

descrito anteriormente. La intensidad de la señal se ajusta opcionalmente entre las dianas dependiendo de su número de copias esperado, si se desea. Las señales de los ácidos nucleicos diana en la célula se comparan opcionalmente con las de una célula de referencia, como se señaló anteriormente.

Una diana de ácido nucleico puede ser esencialmente cualquier ácido nucleico que se detecta deseablemente en la célula. Por ejemplo, una diana de ácido nucleico puede ser un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico, o similares. La diana de ácido nucleico puede ser un ácido nucleico endógeno a la célula. Como ejemplo adicional, la diana puede ser un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno, p. ej., un ARN o ADN genómico viral o bacteriano, un plásmido, un ARNm viral o bacteriano, o similares.

Las primera y segunda (y/u opcionales tercera, cuarta, etc.) dianas de ácido nucleico pueden ser parte de una molécula de ácido nucleico, o pueden ser moléculas separadas. Varias ventajas y aplicaciones de ambos enfoques se comentan con mayor detalle más adelante, p. ej., en la sección titulada "Implementación, aplicaciones y ventajas". En una clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm. En otra clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera región de un ARNm y de la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda región del mismo ARNm. En otra clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico. Las primera y segunda secuencias de polinucleótidos de ADN cromosómico están localizadas opcionalmente en el mismo cromosoma, p. ej., dentro del mismo gen, o en diferentes cromosomas.

Los métodos se pueden aplicar a la detección y la identificación incluso de tipos de células raras. Por ejemplo, la proporción de células del tipo especificado con respecto a las todos los otros tipos en la mezcla es opcionalmente menos de $1:1x10^4$, menos de $1:1x10^5$, menos de $1:1x10^6$, menos de $1:1x10^7$, menos de $1:1x10^8$, o incluso menos de $1:1x10^9$.

Esencialmente, se puede detectar e identificar cualquier tipo de célula que pueda diferenciarse basándose en marcadores adecuados (o regiones redundantes de un único marcador, p. ej., un único ARNm o una región cromosómica amplificada/suprimido) utilizando los métodos. Solo como unos pocos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral circulante, una célula infectada viralmente, una célula fetal en sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (p. ej., sangre u otro fluido corporal), una célula endotelial, una célula endotelial precursora o una células de miocardio en la sangre, una célula madre o una célula T. Los tipos de células raras se pueden enriquecer antes de realizar los métodos, si fuera necesario, por medio de métodos conocidos en la técnica (p. ej., lisis de glóbulos rojos, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, etc.).

Esencialmente se aplican también todas las características señaladas para los métodos anteriores a estas realizaciones, según corresponda; por ejemplo, con respecto a la fuente de la muestra, la fijación y permeabilización de la célula, el lavado de la célula, la desnaturalización de ácidos nucleicos de doble hebra, el tipo de marcas, el uso de sondas de bloqueo opcionales, la detección de señales, la detección (y medición de la intensidad) de las señales de la célula individual mediante citometría de flujo o microscopía, la presencia de la célula en suspensión o inmovilizada sobre un sustrato, y/o similares. Además, las características adicionales descritas en la presente memoria, p. ej., en la sección titulada "Implementación, aplicaciones y ventajas", se puede aplicar a los métodos, según corresponda.

En otro aspecto, se realiza la detección de las células individuales de un tipo especificado como se ha descrito anteriormente, pero no es necesario que las primera y segunda dianas de ácido nucleico sean marcadores redundantes para ese tipo de célula. Las dianas de ácido nucleico pueden ser esencialmente cualquier ácido nucleico deseado, incluyendo, p. ej., marcadores redundantes y/o no redundantes para el tipo de célula.

Composiciones y kits

También se describen en la presente memoria composiciones útiles en la práctica o producidas mediante los métodos. Específicamente se describe una composición que incluye una célula fijada y permeabilizada, cuya célula comprende o se sospecha que comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico, al menos una primera sonda de captura susceptible de hibridar con la primera diana de ácido nucleico, al menos una segunda sonda de captura susceptible de hibridar con la segunda diana de ácido nucleico, una primera sonda marcadora que comprende una primera marca, y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca. Una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. La célula comprende opcionalmente las primera y segunda sondas de captura y sondas marcadoras. Las primera y segunda sondas de captura hibridan opcionalmente con sus respectivas dianas de ácido nucleico en la célula.

También se aplican a las composiciones las características descritas para los métodos anteriores para la captura indirecta de las sondas marcadoras con las dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, las sondas marcadoras pueden hibridar con las sondas de captura. Por lo tanto, la composición incluye una única primera sonda de captura y una única segunda sonda de captura, donde la primera sonda marcadora es susceptible de hibridar con la primera sonda

de captura y la segunda sonda marcadora es susceptible de hibridar con la segunda sonda de captura. Alternativamente, la composición incluye dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, y una pluralidad de las segundas sondas marcadoras. Una única primera sonda marcadora es susceptible de hibridar con cada una de las primeras sondas de captura, y una única segunda sonda marcadora es susceptible de hibridar con cada una de las segundas sondas de captura.

En otro aspecto, los amplificadores se pueden emplear para aumentar el número de sondas marcadoras capturadas con cada diana. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, la composición incluye una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, una pluralidad de las segundas sondas marcadoras, un primer amplificador, y un segundo amplificador. El primer amplificador es susceptible de hibridar con la primera sonda de captura y con la pluralidad de primeras sondas marcadoras, y el segundo amplificador es susceptible de hibridar con la segunda sonda de captura y con la pluralidad de segundas sondas marcadoras. Alternativamente, la composición incluye dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, una multiplicidad de las primeras sondas marcadoras, una multiplicidad de las segundas sondas marcadoras, un primer amplificador, y un segundo amplificador. El primer amplificador es susceptible de hibridar con una de las primeras sondas de captura y con una pluralidad de primeras sondas marcadoras, y el segundo amplificador es susceptible de hibridar con una de las segundas sondas de captura y con una pluralidad de segundas sondas marcadoras.

En otro aspecto, se emplean preamplificadores y amplificadores para capturar las sondas marcadoras con las dianas. En este caso, la composición incluye una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, una multiplicidad de las primeras sondas marcadoras, una multiplicidad de las segundas sondas marcadoras, una pluralidad de primeros amplificadores, una pluralidad de segundos amplificadores, un primer preamplificador, y un segundo preamplificador. El primer preamplificador es susceptible de hibridar con la primera sonda de captura y a la pluralidad de primeros amplificadores, y el segundo preamplificador es susceptible de hibridar con la segunda sonda de captura y con la pluralidad de segundos amplificadores. El primer amplificador es susceptible de hibridar con el primer preamplificador y con una pluralidad de primeras sondas marcadoras, y el segundo amplificador es susceptible de hibridar con el segundo preamplificador y con una pluralidad de segundas sondas marcadoras. De forma similar, la composición incluye dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, una multiplicidad de las primeras sondas marcadoras, una multiplicidad de las segundas sondas marcadoras, una multiplicidad de primeros amplificadores, una multiplicidad de segundos amplificadores, una pluralidad de primeros preamplificadores, y una pluralidad de segundos preamplificadores. El primer preamplificador es susceptible de hibridar con una de las primera sondas de captura y con una pluralidad de primeros amplificadores, el segundo preamplificador es susceptible de hibridar con una de las segundas sondas de captura y con una pluralidad de segundos amplificadores, el primer amplificador es susceptible de hibridar con el primer preamplificador y con una pluralidad de primeras sondas marcadoras, y el segundo amplificador es susceptible de hibridar con el segundo preamplificador y con una pluralidad de segundas sondas marcadoras. Opcionalmente, se pueden utilizar preamplificadores adicionales como intermedios entre un preamplificador hibridado con la sonda o las sondas de captura y los amplificadores.

En las composiciones anteriores, una sonda de captura hibrida con cada sonda marcadora, amplificador, o preamplificador. Alternativamente, dos o más sondas de captura hibridan con la sonda marcadora, amplificador, o preamplificador.

Como se describe en la presente memoria, la composición comprende una pluralidad de las primeras sondas marcadoras, una pluralidad de las segundas sondas marcadoras, un primer polinucleótido amplificado producido mediante amplificación por círculo rodador de un primer polinucleótido circular hibridado con la primera sonda de captura, y un segundo polinucleótido amplificado producido mediante amplificación por círculo rodador de un segundo polinucleótido circular hibridado con la segunda sonda de captura. El primer polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la primera sonda marcadora, y el primer polinucleótido amplificado comprende una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la primera sonda marcadora (y por lo tanto puede hibridar con una pluralidad de las sondas marcadoras). El segundo polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda marcadora, y el segundo polinucleótido amplificado comprende una pluralidad de copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda marcadora. La composición también puede incluir reactivos necesarios para la producción de los polinucleótidos amplificados, por ejemplo, una polimerasa de ácido nucleico suministrada exógenamente, una ligasa de ácido nucleico suministrada exógenamente, y/o nucleósido trifosfatos suministrados exógenamente (p. ej., dNTP).

La célula incluye opcionalmente dianas de ácido nucleico adicionales, y la composición (y la célula) puede incluir reactivos para la detección de estas dianas. Por ejemplo, la célula puede comprender o se puede sospechar que comprende una tercera diana de ácido nucleico, y la composición puede incluir al menos una tercera sonda de captura susceptible de hibridar con la tercera diana de ácido nucleico y una tercera sonda marcadora que comprende una tercera marca. Una tercera señal de la tercera marca es distinguible de las primera y segunda señales. La célula incluye opcionalmente cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico, y la composición incluye opcionalmente cuartas, quintas, sextas, etc. sondas marcadoras y sondas de captura.

Esencialmente se aplican también a las composiciones todas las características señaladas para los métodos anteriores, según corresponda; por ejemplo, con respecto al tipo de diana de ácido nucleico, la ubicación de diversas dianas en una sola molécula o en moléculas diferentes, el tipo de marcas, la inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares. Por ejemplo, vale la pena señalar que la segunda diana de ácido nucleico comprende opcionalmente un ácido nucleico de referencia. En otras realizaciones, las primera y segunda dianas de ácido nucleico sirven como marcadores para un tipo de célula especificado, p. ej., marcadores redundantes.

La célula puede ser esencialmente cualquier tipo de célula de cualquier fuente, particularmente una célula que puede diferenciarse dependiendo de su contenido de ácido nucleico (presencia, ausencia, o número de copias de uno o más ácidos nucleicos). Solo a modo de unos pocos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral circulante, una célula infectada viralmente, una célula fetal en sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (p. ej., sangre u otro fluido corporal), o una célula endotelial, una célula endotelial precursora o la célula de miocardio en la sangre. Por ejemplo, la célula puede derivar de un fluido corporal, sangre, médula ósea, esputo, orina, ganglio linfático, heces, frotis de Papanicolaou cervical, hisopo oral u otro hisopo o frotis, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, semen, fluido linfático, un fluido intercelular, un tejido (p. ej., un producto homogeneizado de tejido), una biopsia, y/o un tumor. La célula puede derivar de uno o más de un ser humano, un animal, una planta, y una célula cultivada.

La célula puede estar presente en una mezcla de células, por ejemplo, una mezcla heterogénea compleja. En una clase de realizaciones, la célula es de un tipo especificado, y la composición comprende uno o más de otros tipos de células. Estas otras células pueden estar presentes en exceso, incluso gran exceso, de la célula. Por ejemplo, la razón de células del tipo especificado con respecto a las células de todos los otros tipos en la composición es opcionalmente menor de $1:1x10^4$, menor de $1:1x10^5$, menor de $1:1x10^6$, menor de $1:1x10^7$, menor de $1:1x10^8$, o incluso menor de $1:1x10^9$.

La célula está opcionalmente inmovilizada sobre un sustrato, presente en una sección de tejido, o similar. Preferiblemente, sin embargo, la célula está en suspensión en la composición. La composición puede estar contenida en un citómetro de flujo o un aparato similar. Las características adicionales descritas en la presente memoria, p. ej., en la sección titulada "Implementación, aplicaciones y ventajas," se pueden aplicar a las composiciones, según corresponda.

También se describen en la presente memoria composiciones en las que un gran número de marcas se correlacionan con cada ácido nucleico diana. Por lo tanto, se describe composición que comprende una célula, cuya célula incluye una primera diana de ácido nucleico, una segunda diana de ácido nucleico, una primera marca, cuya presencia en la célula es indicativa de la presencia de la primera diana de ácido nucleico en la célula, y una segunda marca cuya presencia en la célula es indicativa de la presencia de la segunda diana de ácido nucleico en la célula, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca. Está presente un promedio de al menos una copia de la primera marca en la célula por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y está presente un promedio de al menos una copia de la segunda marca en la célula por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico.

En una alternativa, las copias de la primera marca se asocian físicamente con la primera diana de ácido nucleico, y las copias de la segunda marca se asocian físicamente con la segunda diana de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera marca puede ser parte de una primera sonda marcadora y la segunda marca parte de una segunda sonda marcadora, donde se capturan las sondas marcadoras con los ácidos nucleicos diana.

Puede estar presente un promedio de al menos cuatro, ocho, o doce copias de la primera marca en la célula por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y puede estar presente un promedio de al menos cuatro, ocho o doce copias de la segunda marca en la célula por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico. Alternativamente, pueden estar presentes en la célula un promedio de al menos dieciséis copias de la primera marca por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico sobre una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y puede esta rpresente un promedio de al menos dieciséis copias de la segunda marca en la célula por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico.

Esencialmente todas las características observadas para las realizaciones anteriores se aplican también a estas composiciones, según corresponda, p. ej., con respecto al tipo de marcas, la suspensión de la célula, y/o similares. Las regiones de las primera y segunda dianas de ácido nucleico son típicamente regiones cubiertas por una sonda, cebador, o polinucleótido similar empleados para detectar la diana respectiva. Las regiones de las primera y segunda dianas de ácido nucleico opcionalmente abarcan al menos 25, 50, 100, 200, o más nucleótidos contiguos y/o a lo sumo 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, o menos nucleótidos. Una densidad similar de marcas se captura opcionalmente con las tercera, cuarta, quinta, sexta, etc. dianas de ácido nucleico. La composición incluye opcionalmente cebadores de PCR, una polimerasa termoestable, y/o similares, en realizaciones en las que las

dianas son detectadas por PCR múltiplex in situ.

Se describen también kits para la práctica de los métodos. Una clase general de kits permite la detección de una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico en una célula individual. El kit incluye al menos un reactivo para la fijación y/o permeabilización de la célula, al menos una primera sonda de captura susceptible de hibridar con la primera diana de ácido nucleico, al menos una segunda sonda de captura susceptible de hibridar con la segunda diana de ácido nucleico, una primera sonda marcadora que comprende una primera marca, y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca, en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca, empaquetados en uno o más recipientes.

Esencialmente todas las características señaladas para los métodos y composiciones anteriores se aplican también a los kits, según corresponda; por ejemplo, con respecto al número de dianas de ácido nucleico, la configuración y el número de las sondas marcadoras y de captura, la inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, la inclusión de sondas de bloqueo, la inclusión de reactivos de amplificación, el tipo de ácido nucleico diana, la ubicación de diversas dianas en una sola molécula o en diferentes moléculas, el tipo de marcas, la inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares. El kit opcionalmente también incluye instrucciones para la detección de las dianas de ácido nucleico en la célula y/o la identificación de que la célula es de un tipo especificado, una o más soluciones tamponadas (p. ej., diluyente, tampón de hibridación, y/o tampón de lavado), una o varias células de referencia que comprenden una o más de las dianas de ácido nucleico, y/o similares.

Por lo tanto, se describe en la presente memoria un kit para detectar una célula individual de un tipo especificado a partir de una mezcla de tipos de células mediante la detección de una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. El kit incluye al menos un reactivo para la fijación y/o permeabilización de la célula, una primera sonda marcadora que comprende una primera marca (para la detección de la primera diana de ácido nucleico), y una segunda sonda marcadora que comprende una segunda marca (para la detección de la segunda diana de ácido nucleico), en donde una primera señal de la primera marca es distinguible de una segunda señal de la segunda marca, empaquetados en uno o más recipientes. El tipo especificado de célula es distinguible de los otros tipos de células en la mezcla por la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico en la célula o por la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula (es decir, las dos dianas son marcadores redundantes para el tipo de célula especificado).

Esencialmente todas las características señaladas para los métodos y composiciones anteriores se aplican también a estos kits, según corresponda; por ejemplo, con respecto al número de dianas de ácido nucleico, la inclusión de sondas de captura, la configuración y número de las sondas marcadoras y/o de captura, la inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, la inclusión de sondas de bloqueo, la inclusión de reactivos de amplificación, el tipo de diana de nucleico ácido, la ubicación de diversas dianas en una sola molécula o en moléculas diferentes, el tipo de marcas, la inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares. El kit también incluye opcionalmente instrucciones para identificar que la célula es del tipo especificado, una o más soluciones tamponadas (p. ej., diluyente, tampón de hibridación, y/o tampón de lavado), una o varias células de referencia que comprenden una o más dianas de ácido nucleico, y/o similares.181[]

Implementación, aplicaciones y ventajas

Varios aspectos de la invención se describen con detalle adicionalmente a continuación. También se describen realizaciones y aplicaciones ilustrativas.

La nueva tecnología (métodos, composiciones, sistemas y kits), QMAGEX (Quantitative Múltiplex Analysis of Gene Expression in Single Cell), descrita en la presente memoria es susceptible de detección y cuantificación de múltiples ácidos nucleicos dentro de las células individuales. La tecnología es significativamente diferente de la tecnología HIS existente en varios aspectos, aunque ambas pueden medir la expresión del ARNm en las células individuales. En primer lugar, las células permanecen preferiblemente en estado de suspensión durante todas o al menos la mayoría de las etapas de ensayo en los ensayos de la presente invención, lo que mejora en gran medida la cinética de hibridación de ensayo, dando como resultado una mejor reproducibilidad y menor tiempo de ensayo. En segundo lugar, la tecnología actual tiene la capacidad para analizar la expresión de múltiples transcritos de ARNm en las células simultáneamente y cuantitativamente. Esto es muy deseable, ya que, por ejemplo, la detección de múltiples genes marcadores de tumores podría mejorar en gran medida la precisión de la identificación de CTC (Mocellin et al., 2004) y reducir considerablemente la tasa de falsos positivos. El análisis cuantitativo del nivel de expresión génica no solo podría ayudar adicionalmente a la discriminación de las CTC de otros tipos de células, sino también podría ayudar a distinguir el tipo y el origen de los tumores primarios, así como las fases del progreso del tumor. En tercer lugar, la tecnología actual permite el uso de un citómetro de flujo como base para la detección, lo que, en comparación con los instrumentos de detección basados en el microscopio, ofrece un mayor rendimiento. Además, el citómetro de flujo es capaz de clasificar células, p. ej., células tumorales, para el estudio adicional. Con posterioridad a la detección y cuantificación de la expresión del ARNm, el aislamiento de las CTC u otras células puede ser ventajoso para la posterior confirmación de la identidad o para análisis citológicos y moleculares adicionales. En cuarto lugar, la tecnología actual ha mejorado enormemente la sensibilidad de detección y la reproducibilidad, y es susceptible de detección y cuantificación de una sola copia de genes. Además, la presente tecnología utiliza un patrón, un conjunto genérico de tecnología marcaje y detección de sondas (p. ej., el mismo

conjunto de preamplificadores, amplificadores, y sondas marcadoras se puede utilizar para detectar múltiples conjuntos diferentes de dianas de ácido nucleico, requiriendo solo la síntesis de un nuevo conjunto de sondas de captura para cada nuevo conjunto de dianas de ácido nucleico), y opcionalmente utiliza procedimientos normalizados para la fijación y la permeabilización y para la hibridación y el lavado de las células. Además, la tecnología puede incluir controles internos incorporados para la especificidad y la eficacia del ensayo.

La tecnología actual se puede utilizar no solo para la detección y enumeración de CTC raras en muestras de sangre u otros fluidos corporales, sino también para cualquier tipo de eventos de identificación y enumeración de células raras. Las aplicaciones incluyen, pero sin limitación: detección de enfermedad mínima residual en leucemia y linfoma; verificación de la recurrencia después del tratamiento de quimioterapia (Hess et al.); detección de otras células pre-cancerosas, tales como la detección de células del cuello uterino que contiene el VPH en los fluidos corporales; detección de ácido nucleico viral o bacteriano en una célula infectada; detección de células fetales en la sangre materna; detección de lesiones micro-tumorales durante la etapa temprana del crecimiento del tumor; o detección de células tumorales residuales después de la cirugía para la gestión de márgenes. En todos estos casos, es probable que la expresión génica específica de la célula diana esté sepultada en el fondo de un gran número de poblaciones de células heterogéneas. Como resultado, los análisis de expresión basados en micromatrices o RT-PCR, que requieren el aislamiento del ARNm a partir de una gran población de células, tendrán dificultades para detectar la presencia de aquellos eventos de células raras con precisión o fiabilidad, mientras que la tecnología inventada se puede aplicar fácilmente.

También hay que señalar que aunque la detección y cuantificación en una sola célula de múltiples transcritos de ARNm se ilustra aquí como la aplicación principal, tal tecnología es igualmente aplicable a la detección de otros eventos de células raras que incluyen cambios en el ADN cromosómico o el contenido de ácido nucleico celular. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, la detección de la amplificación del gen Her-2/neu, la detección de la deleción del gen Rb, la detección de mutaciones somáticas, la detección de translocación cromosómica como en la leucemia mielógena crónica (BCR-ABL), o la detección de la inserción del VPH en el ADN cromosómico de células de cáncer de cuello uterino.

Finalmente, se puede aplicar los aspectos del diseño, multiplexación y amplificación de sondas de la presente tecnología en el análisis de la expresión génica, múltiplex cuantitativa y en la medición de cambios en el ADN cromosómico a nivel de una sola célula en secciones sólidas de tejido, tales como muestras de tejido fijadas con formalina, incluidas en parafina (FFPE).

La tecnología QMAGEX comprende un ensayo y un aparato asociado opcional para implementar el ensayo de forma automatizada. La **Figura 1** ilustra los elementos principales del flujo de trabajo del ensayo QMAGEX, que, para una realización ejemplar en que se emplean amplificadores, incluyen:

Fijación y permeabilización: Las células de la muestra se fijan y se vuelven permeables (permeabilizan) en suspensión. La etapa de fijación inmoviliza los ácidos nucleicos (p. ej., ARNm o ADN cromosómico) y los entrecruza con la estructura celular. A continuación, la membrana celular se permeabiliza de manera que las sondas de ácido nucleico específicas de la diana y las partículas generadoras de señales, tales sondas de ácido nucleico marcadas fluorescentemente, puedan entrar en la célula y unirse a la diana.

Desnaturalización: Si la diana de detección es ADN cromosómico de doble hebra, se añade una etapa de desnaturalización para convertir la diana de doble hebra en el ADN de hebra sencilla, listo para ser unido con las sondas específicas de la diana.

Hibridación con sondas de captura: Las sondas de captura específicas de la diana seleccionadas cuidadosamente o los conjuntos de sondas hibridan con los ácidos nucleicos diana. Las sondas de captura sirven para conectar las moléculas diana específicamente a partículas generadoras de señal. La tecnología permite que múltiples genes diana de la célula sean reconocidos por diferentes conjuntos de sondas de forma simultánea y con un alto grado de especificidad.

Amplificación de la señal: Las señales de las moléculas diana se amplifican mediante unión de una molécula de armazón grande, un amplificador, a las sondas de captura o conjuntos sondas. Cada armazón tiene múltiples ubicaciones para aceptar sondas marcadoras y partículas generadores de señal. En un análisis múltiplex, se utilizan múltiples amplificadores distintos.

Marcaje: Las sondas marcadoras, a las cuales se anclan partículas generadoras de señales (marcas), hibridan con el amplificador en esta etapa. En un análisis múltiplex, se utilizan múltiples sondas marcadoras distintas.

Lavado: El exceso de sondas o partículas generadoras de señales que no están unidas o que se unen de manera no específica a las células se eliminan a través de una etapa de lavado, lo que reduce el ruido de fondo y mejora la razón de la señal de detección con respecto al ruido. Se pueden añadir etapas de lavado adicionales durante las etapas de hibridación de la sonda de captura o de amplificación de la señal potenciar adicionalmente el rendimiento del ensayo.

Detección: Las células en suspensión marcadas se detectan utilizando clasificación de células activadas por

fluorescencia (FACS) o un citómetro de flujo, o se inmovilizan sobre una superficie sólida y se detectan utilizando un microscopio o un aparato basado en un escáner.

En la siguiente sección, se describirán en detalle los elementos principales de la tecnología QMAGEX. En lo siguiente, el término sonda marcadora se refiere a una entidad que se une a la molécula diana, directamente o indirectamente, y permite que la diana sea detectada por un aparato de lectura. La sonda marcadora, en general, comprende un ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico modificado que se une a la diana, directamente o indirectamente, y una o más "partículas generadoras de señales" (es decir, una marca) que produce la señal reconocible por el aparato de lectura. En el modo indirecto, la sonda marcadora, se puede unir a la molécula diana a través de la unión a una sonda de captura directamente o a través de la unión a un amplificador que a su vez está unido a una sonda de captura. Las partículas generadoras de señales ilustrativas (marcas) incluyen, pero sin limitación, moléculas fluorescentes, nanopartículas, isótopos radioactivos, moléculas quimioluminiscentes (p. ej., digoxigenina, dinitrofenilo). Las moléculas fluorescentes incluyen, pero sin limitación, fluoresceína (FITC), Cy3, Cy5, colorantes Alexa, ficoeritrina, etc. Las nanopartículas incluyen, pero sin limitación, puntos cuánticos fluorescentes, partículas difusoras, etc. El término sonda de captura se refiere a un ácido nucleico o un ácido nucleico modificado que conecta la diana de un tipo específico de sonda marcadora, directa o indirectamente. El término "conjunto de sondas de captura" se refiere a múltiples ácidos nucleicos o ácidos nucleicos modificados que conectan una diana con un tipo especificado de sonda marcadora, directa o indirectamente, para aumentar la sensibilidad del ensayo. El término amplificador se refiere a una o varias moléculas de armazón grande que se unen a una o más sondas de captura o a un preamplificador en un lado y a múltiples sondas marcadoras en otro lado.

Fijación

En esta etapa, los ácidos nucleicos se inmovilizan dentro de las células mediante entrecruzamiento dentro de la estructura celular. Existe una variedad de métodos bien conocidos para fijar células en suspensión con un reactivo fijador y para bloquear las actividades ARNasa endógenas, que se pueden adaptar para su uso en la presente invención. Los reactivos fijadores incluyen formalina (formaldehído), paraformaldehído, glutaraldehído, etanol, metanol, etc. Una disolución fijadora común para las secciones de tejido incluye glutaraldehído al 0,25% y paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato. Otra disolución fijadora común para secciones de tejido incluye etanol al 50%, formalina al 10% (que contiene formaldehído al 37%), y ácido acético al 5%. Se someten a ensayo opcionalmente diferentes combinaciones de los reactivos fijadores a diversas concentraciones para encontrar la composición óptima para fijar las células en suspensión, utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. La duración del tratamiento de fijación también se puede optimizar. Se pueden incluir numerosos inhibidores de ARNasa diferentes en la disolución fijadora, tales como RNAlater (Ambion), ácido cítrico o LiCl, etc.

Permeabilización

La fijación da como resultado el entrecruzamiento de los ácidos nucleicos diana con proteínas u otros componentes celulares dentro de las células, lo que puede dificultar o impedir la infiltración de las sondas de captura en las células y enmascarar las moléculas diana para la hibridación. Los análisis de la invención por lo tanto incluyen típicamente una etapa de seguimiento de la permeabilización para permitir la hibridación dentro de la célula. Una técnica consiste en la aplicación de calor durante distintos períodos de tiempo para romper el entrecruzamiento. Esto se ha demostrado para aumentar la accesibilidad del ARNm de las células para la hibridación. También se pueden utilizar detergentes (p. ej., Triton X-100 o SDS) y proteinasa K para aumentar la permeabilidad de las células fijadas. El tratamiento con detergente, generalmente con Triton X-100 o SDS, se utiliza con frecuencia para permeabilizar las membranas mediante la extracción de los lípidos. La proteinasa K es una proteasa no específica que es activa a lo largo de un intervalo de pH amplio y no se inactiva fácilmente. Se utiliza para digerir las proteínas que rodean el ARNm diana. Una vez más, se pueden determinar experimentalmente las concentraciones y la duración del tratamiento óptimas como es bien conocido en la técnica. Puede seguir una etapa de lavado de células, para eliminar los materiales disueltos producidos en la etapa de permeabilización.

Opcionalmente, antes de la fijación y la permeabilización, las células en suspensión se recogen y se tratan para inactivar la ARNasa y/o para reducir la autofluorescencia. Se ha demostrado que el tratamiento con DEPC (p. ej., Braissant y Wahli (1988) "A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections" Biochemica 1:10-16) y RNAlater (Ambion, Inc.) es eficaz en la estabilización y protección de ARN celular. También se ha demostrado que el borohidruro de sodio y un calor elevado conservan la integridad de ARN y reducen la autofluorescencia, facilitando la detección de los genes expresados en un bajo nivel (Capodieci et al. (2005) "Gene expression profiling in single cells within tissue" Nat Methods 2(9):663-5). Se emplean opcionalmente otros métodos para reducir la autofluorescencia celular tales como el azul de trípano (Mosiman et al. (1997) "Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method" Cytometry 30(3):151-6) o una sonda oligonucleotídica extintora marcado individualmente (Nolan et al. (2003) "A simple quenching method for fluorescence background reduction and its application to the direct, quantitative detection of specific mRNA" Anal Chem. 2003 75(22):6236-43).

Hibridación con la sonda de captura

En esta etapa del ensayo, la sonda de captura o el conjunto de sondas de captura se unen a la molécula diana

pretendida mediante hibridación. Un indicador de la hibridación satisfactoria con la diana es la especificidad, es decir, las sondas o conjuntos de sondas de captura deben conectar solo sustancialmente las sondas marcadoras con la molécula diana específica de interés, no con ninguna otra molécula. La selección y el diseño de la sonda son importantes para lograr una hibridación específica.

Selección y diseño de la sonda

Los ensayos de la invención emplean dos tipos de enfoques en el diseño de la sonda para conectar los ácidos nucleicos diana de las células a las partículas generadoras de señal: "marcaje directo" y "marcaje indirecto". En el enfoque de marcaje directo, la molécula diana hibrida con o captura una o más sondas marcadoras (LP) directamente. Las LP contienen las partículas de generadores de señal (SGP), como se muestra en la Figura 2. Es necesario utilizar una LP diferente para anclar SGP adicionales en diferentes posiciones sobre la molécula diana. Con el fin de garantizar la especificidad de la hibridación, la sonda marcadora se selecciona preferiblemente de manera rigurosa para asegurar que no presenta hibridación cruzada con secuencias de ácido nucleico no específicas.

En el enfoque de marcaje indirecto, se emplea una sonda de captura (CP) adicional. En la Figura 3. se muestra un ejemplo. La molécula diana captura la sonda marcadora a través de la sonda de captura. En cada sonda de captura, hay al menos una sección, T, complementaria a una sección sobre la molécula diana, y otra sección, L, complementaria a una sección en la sonda marcadora. Las secciones T y L están conectadas por una sección C. Para anclar más SGP a diferentes posiciones en la misma molécula diana, se necesitan diferentes sondas de captura, pero la sonda marcadora puede seguir siendo la misma. La secuencia de L se selecciona cuidadosamente para asegurar que no presenta hibridación cruzada sustancialmente con ninguna de las secuencia de los ácidos nucleicos de las células. En una realización adicional, la porción L de la sonda de captura y la sonda marcadora contiene nucleótidos modificados químicamente o no naturales que no hibridan con los nucleótidos naturales de las células. En otra realización, L y la sonda marcadora (o una porción de la misma) ni siquiera son secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, L puede ser un anticuerpo de unión de afinidad débil que reconoce la sonda generadora de señal, que en este caso es o incluye un antígeno; L se puede conjugar covalentemente con un oligonucleótido que comprende la sección T de la sonda de captura. Opcionalmente, para dos sondas de captura adyacentes, las secciones T hibridan con la diana y dos de los anticuerpos de unión de baja afinidad se unen al antígeno sobre la sonda marcadora, al mismo tiempo, lo que da como resultado una unión de fuerte afinidad del antígeno. Las sondas de captura y marcadora son específicas para un gen diana de interés. Se pueden unir múltiples sondas de captura (conjunto de sondas) al mismo gen diana de interés con el fin de anclar más partículas generadoras de señal para una mayor sensibilidad de detección. En esta situación, el conjunto de sondas para el mismo gen diana puede compartir la misma sonda marcadora.

Aunque ambos enfoques se pueden utilizar en la tecnología actual, se prefiere el enfoque de captura indirecta, ya que permite que la sonda marcadora sea localizada independientemente y una descripción adicional demostrará que puede ofrecer mejor especificidad y sensibilidad.

En una realización de captura indirecta adicional mostrada en la Figura 4, dos sondas de captura adyacentes se incorporan a un conjunto de sondas dirigidas a un gen de interés. T1 y T2 se diseñan para que sean complementarios a dos secciones únicas y adyacentes sobre el ácido nucleico diana. L1 y L2, que puede ser diferentes o iguales, son complementarios a dos secciones adyacentes sobre la sonda marcadora. Sus secciones de unión, T, L o ambas, se diseñan de manera que la conexión entre la sonda marcadora y el diana sea inestable y tienda a caer a la temperatura de hibridación cuando solo una de las sondas de captura está en su lugar. Tal diseño debería permitir una especificidad excepcional debido a que la sonda marcadora generadora de señal solo se puede anclar al gen diana de interés cuando dos sondas de captura independientes reconocen ambas la diana y se unen a las secuencias adyacentes o muy cerca del gen diana. En una realización adicional, la temperatura de fusión, T_m, de las secciones T de las dos sondas de captura se diseña para que se encuentre significativamente por encima de la temperatura de hibridación mientras que la Tm de las secciones L es inferior a la temperatura de hibridación. Como resultado, las secciones T se unen a la molécula diana fuertemente y de forma estable durante la hibridación, mientras que las secciones L se unen a la sonda marcadora débilmente y de forma inestable si solo una de las sondas de captura está presente. Sin embargo, si las dos sondas de captura están presentes, la combinación de L1 y L2 retiene la sonda marcadora fuertemente y de forma estable durante la hibridación. En otra realización, la Tm de las secciones T está por debajo de la temperatura de hibridación mientras que Tm de las secciones L está sustancialmente por encima. De la misma manera, la conexión entre la sonda marcadora y la diana solo puede sobrevivir a la hibridación cuando ambas sondas de captura hibridan con la diana de manera cooperativa.

En otra realización, se utilizan tres o más de las sondas de captura próximas, específicas del ácido nucleico diana para la captura estable de una sonda marcadora dentro de las células (Figura 5). El diseño básico de las sondas es el mismo que se ha comentado anteriormente, pero la captura de una sonda generadora de señal debe tener incluso mayor especificidad que cuando se utilizan dos sondas próximas puesto que ahora tres sondas independientes tienen que unirse a la misma molécula diana de interés en posiciones próximas vecinas con el fin de generar la señal.

Multiplexación

Para llevar a cabo la detección multiplexada para más de un gen diana, p. ej., como se muestra en la Figura 6, cada gen diana tiene que ser unido específicamente por diferentes sondas de captura y marcadoras. Además, la partícula generadora de señal (la marca) anclada a la sonda marcadora debe proporcionar señales claramente diferentes para cada diana que pueden ser leídas por el aparato de detección. En el mecanismo de marcaje directo (p. ej., Figura 6 panel A), las sondas marcadoras adecuadas con mínima hibridación cruzada pueden ser más difíciles de encontrar puesto que cada sonda marcadora tiene que ser susceptible de unirse a la diana fuertemente pero no de presentar hibridación cruzada con cualquier otra molécula de ácido nucleico en el sistema. Para que este enfoque proporcione resultados óptimos, la porción de unión a la diana de la sonda marcadora se debe diseñar oportunamente de modo que no presente hibridación cruzada con secuencias no específicas. En el enfoque de marcaje indirecto (p. ej., Figura 6 Panel B), debido al enfoque de diseño de la sonda de captura múltiple único, incluso cuando una sonda de captura se une a una diana no específica, esto no dará como resultado la unión de la sonda marcadora a la diana no específica. La especificidad del ensayo se puede mejorar en gran medida. De este modo, el diseño de la sonda de captura ilustrado en la Figura 4 y la Figura 5 se prefiere típicamente en algunas aplicaciones de ensayo múltiplex. En una clase de realizaciones, las partículas generadoras de señal ancladas a los diferentes genes diana son diferentes moléculas fluorescentes con espectros distintivos de emisión.

La capacidad de la presente tecnología para medir más de un parámetro simultáneamente puede permitir la detección de células raras en una gran población heterogénea de células. Como se ha indicado anteriormente, se estima que la concentración de CTC está en el intervalo de una célula tumoral entre cada 10^6-10^7 células sanguíneas normales. En los inmunoensayos basados en FACS existentes, por otra parte, la agregación de colorante al azar en las células puede producir un recuento de células falso positivo en cada diez mil células. Por lo tanto no se puede utilizar tal ensayo para la detección de CTC debido a las inaceptablemente altas tasas de falsos positivos. Este problema se puede resolver elegantemente utilizando la tecnología actual. En una realización particular, se utiliza la expresión de más de un gen tumoral como diana para la detección múltiplex. Solamente las células que expresan todos los genes diana se recuentan como células tumorales. De esta manera, la tasa de falsos positivos de la detección de la CTC se puede reducir drásticamente. Por ejemplo, ya que la agregación de colorante en las células es un evento aleatorio, si la tasa de falsos positivos de detección de un solo color es 10^{-4}, la tasa de falsos positivos para la detección de dos colores o de tres colores puede ser tan baja como 10^{-8} o 10^{-12}, respectivamente. En situaciones en la que se conocen los niveles relativos de expresión de los genes diana, estos niveles relativos pueden medirse utilizando los métodos de detección múltiplex descritos en la presente memoria y se puede utilizar la información para reducir la tasa de falsos positivos de la detección.

En un ejemplo, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 7 Panel A, más de una partícula generadora de señal está conectada al mismo ácido nucleico diana. Estas partículas generan señales diferentes en el aparato de detección. Las intensidades relativas de estas señales se pueden determinar previamente planificando el número de cada tipo de partículas anclado a la diana. El número de partículas generadoras de señal sobre una diana se puede controlar en el diseño de la sonda cambiando el número de conjuntos de sondas o empleando diferentes métodos de amplificación de la señal, p. ej., como se describe en la siguiente sección. Las células raras se identifican solo cuando las intensidades de señal relativas de estas partículas medida por el aparato de detección son iguales a los valores predeterminados. Esta realización es útil cuando no hay suficientes marcadores adecuados o cuando sus niveles de expresión son desconocidos en un tipo concreto de células raras. En otra realización más, como se muestra en la Figura 7 Panel B, el mismo conjunto de partículas generadoras de señal se ancla a más de una diana. Las intensidades de la señal relativas del conjunto de partículas se controlan para que sean iguales en todas las dianas seleccionadas. Esta realización es útil en situaciones en las que la célula rara es identificada cuando cualquiera de las moléculas diana se encuentra presente. En otra realización más, representada en la Figura 7 Panel C, cada molécula diana tiene un conjunto de partículas generadoras de señal anclado a la misma, pero los conjuntos de partículas son claramente diferentes de diana a diana.

La detección de múltiples especies de ácidos nucleicos diana de interés se puede aplicar a la medición cuantitativa de una diana. Debido a las diferentes muestras y condiciones experimentales, la abundancia de una molécula diana concreta en una célula normalmente no se puede determinar con precisión mediante la detección del nivel de señal asociado con la diana. Sin embargo, la medición más precisa se puede lograr mediante la normalización de la señal de un gen de interés a la de un gen de referencia/constitutivo. Un gen de referencia/constitutivo se define como un gen que generalmente siempre está presente o se expresa en las células. La expresión del gen de referencia/constitutivo es en general constitutiva y tiende a no cambiar bajo diferentes condiciones biológicas. 18S, 28S, GAPD, ACTB, PPIB etc. han sido considerados generalmente como genes de referencia o constitutivos, y se han utilizado en la normalización de los datos de expresión génica generados a partir de diferentes muestras y/o bajo diferentes condiciones de ensayo.

En otra realización, se puede diseñar un conjunto de sondas marcadoras especiales que no se une a ninguna sonda de captura o diana específicamente. La señal asociada con esta sonda marcadora se puede utilizar para establecer el fondo de la señal de hibridación en las células individuales. De este modo, se puede determinar cuantitativamente la abundancia de una molécula diana concreta restando primero la señal de hibridación de fondo, normalizando después frente a la señal de hibridación del gen de referencia/constitutivo restado del fondo.

En otra realización más, se pueden detectar simultáneamente en las células dos o más secuencias de ADN cromosómico de interés. En la detección de múltiples secuencias de ADN en las células, las sondas marcadoras para las secuencias de ADN son diferentes entre sí y no presentan hibridación cruzada entre sí. En realizaciones en las que se emplea la captura indirecta cooperativa, a causa del esquema de diseño, incluso cuando una sonda se une a una secuencia de ADN no específica, no dará lugar a la captura de la sonda generadora de señal por las secuencias de ADN no específicas.

En otra realización más, la detección de múltiples secuencias de ADN cromosómicas diana de interés permite el análisis cuantitativo de la amplificación del gen, la deleción del gen, o la translocación de genes en células individuales. Esto se logra mediante la normalización de la señal de un gen de interés a la de un gen de referencia. La razón de la señal del gen de interés con respecto al gen de referencia para una célula concreta de interés se compara con la razón en las células de referencia. Un gen de referencia se define como un gen que mantiene de forma estable su número de copias en el ADN genómico. Un célula de referencia se define como una célula que contiene el número de copias normal del gen de interés y el gen de referencia. Si la razón de la señal es mayor en las células de interés en comparación con las células de referencia, se detecta la amplificación del gen. Si la relación es menor en las células de interés en comparación con las células de referencia, en ese caso se detecta la deleción del gen.

Amplificación de la señal y marcaje

El enfoque de marcaje directo representado en Figura 2 y la Figura 6 Panel A ofrece solamente una sensibilidad limitada debido a que solo un número relativamente pequeño de partículas generadoras de señal (marcas) se puede unir a cada sonda marcadora. Una forma de aumentar la sensibilidad es utilizar ARN transcrito in vitro que incorpora partículas generadoras de señal, pero como resultado la especificidad se resentirá.

El enfoque de "marcaje indirecto" no solo puede mejorar la especificidad como se ha descrito anteriormente, sino que también se puede utilizar para mejorar la sensibilidad de detección. En este enfoque, la sonda marcadora se hibrida o se conectado con una molécula amplificadora, lo que proporciona muchas más localizaciones de unión para las sondas marcadoras. La estructura y el método de anclaje del amplificador pueden adoptar muchas formas. La Figura 8 Paneles A-D muestra varios esquemas de amplificación como ejemplos ilustrativos. En el Panel A, múltiples sondas marcadoras marcadas individualmente se unen al amplificador. En el Panel B, múltiples sondas marcadoras marcadas múltiplemente se unen al amplificador. En el Panel C, múltiples sondas marcadoras marcadas individualmente se unen al amplificador, y múltiples copias del amplificador se unen a un preamplificador. En una realización particular, el amplificador es una o múltiples moléculas de ADN ramificadas **(**Panel D). La secuencia de la sonda marcadora se selecciona preferiblemente con cuidado para que no hibriden de forma cruzada sustancialmente con ningún ácidos nucleicos endógenos en la célula. De hecho, la sonda marcadora no tiene que ser una molécula de polinucleótido natural. La modificación química de la molécula, por ejemplo, y la inclusión de nucleótidos no naturales, puede garantizar que la sonda marcadora hibride solo con el amplificador y no con las moléculas de ácido nucleico de origen natural de las células. En los ensayos múltiplex, se diseñarán distintos amplificadores y sondas marcadoras y se utilizarán para las diferentes dianas.

Como se ilustra esquemáticamente en la Figura 9**,** una molécula de polinucleótido circular es capturada por el conjunto de sondas de captura. A lo largo del círculo, puede haber una secuencia o más de una repetición de la misma secuencia que se une a la sonda marcadora (Figura 9 Panel A). En la etapa de amplificación de la señal del ensayo, se lleva a cabo un procedimiento de amplificación por círculo rodador (Larsson et al, 2004). Como resultado de este procedimiento, se produce una molécula de polinucleótido de cadena larga anclada a las sondas de captura (Figura 9 Panel B). Existen muchas secuencias repetitivas a lo largo de la cadena, sobre la cual se pueden anclar las sondas marcadoras mediante hibridación **(**Figura 9 Panel C). En los ensayos múltiplex, se diseñarán y se utilizarán distintas sondas de captura, círculos rodadores, y sondas marcadoras.

En una realización, una porción de la sonda generadora de señal puede ser amplificada por PCR. En otra realización, cada porción de las múltiples sondas generadoras de señal se puede amplificar mediante PCR simultáneamente.

Aunque se ha utilizado un enfoque de captura específico (marcaje indirecto con pares de sondas de captura) para ilustrar los esquemas de marcaje y amplificación en las Figuras 8 y 9, es importante tener en cuenta que se puede utilizar cualquier otro enfoque de captura de la sonda, directo o indirecto, descrito en las secciones anteriores combinado con los esquemas de marcaje y amplificación descritos en estas secciones. La sonda de captura, los métodos de marcaje, y las configuraciones del amplificador descritos anteriormente son independientes entre sí y se pueden utilizados en cualquier combinación en un diseño de ensayo concreto.

Condiciones de hibridación

La composición de la solución de hibridación puede afectar a la eficiencia del procedimiento de hibridación. La hibridación depende típicamente de la capacidad del oligonucleótido para recocerse con una hebra de ARNm complementaria por debajo de su punto de fusión (Tm). El valor de Tm es la temperatura a la cual la mitad del dúplex de oligonucleótido está presente en forma de hebra sencilla. Los factores que influyen en la hibridación de las

sondas de oligonucleótidos con los ácidos nucleicos diana pueden incluir la temperatura, el pH, la concentración de catión monovalente, la presencia de disolventes orgánicos, etc. Una solución de hibridación típica puede contener algunos o todos los siguientes reactivos, p. ej., sulfato de dextrano, formamida, DTT (ditiotreitol), SSC (NaCl más citrato de sodio), EDTA, etc. También pueden añadirse otros componentes para disminuir la posibilidad de unión no específica de las sondas de oligonucleótidos, incluyendo, p. ej., ADN de hebra sencilla, ARNt que actúa como un ARN transportador, poliA, solución de Denhardt, etc. Las condiciones de hibridación ilustrativas se pueden encontrar en la técnica y/o determinar empíricamente como es bien conocido en la técnica. Véanse, p. ej., la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2002/0172950, Player et al. (2001) J. Histochem. Cytochem. 49:603-611, and Kenny et al. (2002) J. Histochem. Cytochem. 50:1219-1227, que también describen la fijación, permeabilización, y lavado.

Opcionalmente se lleva a cabo una prehibridación opcional para reducir la tinción del fondo. La prehibridación implica incubar el tejido fijado o las células con una solución que se compone de todos los elementos de la solución de hibridación, menos la sonda.

Lavado

Después de la etapa de marcaje, las células se lavan preferiblemente para eliminar las sondas no unidas o las sondas que se han unido ligeramente a secuencias emparejadas imperfectamente. El lavado se inicia generalmente con un tampón de lavado de bajo rigor tal como 2 X SSC + EDTA 1 mM (1 X SSC es NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M), seguido a continuación de lavado con tampón de lavado de más alto rigor tal como 0,2 X SSC + EDTA 1 mM o 0,1 X SSC + EDTA 1 mM.

El lavado es importante para reducir el ruido de fondo, mejorar la razón de señal a ruido y la cuantificación con el ensayo. Los procedimientos de lavado establecidos se pueden encontrar, p. ej., en Bauman y Bentvelzen (1988) "Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent in situ hybridization" Cytometry 9(6):517-24 y Yu et al. (1992) "Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry" Nucleic Acids Res. 20(1):83-8.

El lavado se puede llevar a cabo mediante la ejecución de un número adecuado de ciclos de lavado, es decir, uno o más. Cada ciclo en general incluye las siguientes etapas: mezclar las células con una solución tampón adecuada, desprender los materiales unidos no específicamente de las células, y eliminar el tampón junto con los residuos. Cada etapa se describe con más detalle a continuación.

Mezclar las células con tampón de lavado: En algunos ensayos, las células se inmovilizan sobre la superficie de un sustrato antes de ser lavadas. En tales casos, el tampón de lavado se mezcla junto con la superficie del sustrato. En muchas otras realizaciones, las células que se van a lavar flotan libremente. El tampón de lavado se añade a los sedimentos celulares o a la solución en la cual están flotando las células.

Desprender los materiales unidos no específicamente de las células: Se pueden emplear cualquiera de varias técnicas empleadas aquí para reducir la unión no específica después del tratamiento de permeabilidad celular y la hibridación de la sonda para fomentar que las sondas unidas no específicamente se desprendan de las células y se disuelvan en el tampón de lavado. Éstas incluyen el aumento de la temperatura justo por debajo de la temperatura de fusión de las sondas unidas específicamente y emplear agitación utilizando un agitador magnético o mecánico o la perturbación con ondas sónicas o ultrasónicas. La agitación de la mezcla también se puede lograr, sacudiendo el recipiente con un movimiento de balanceo o vórtice.

Retirar el tampón junto con los residuos: Se puede emplear cualquier método conveniente para separar y eliminar el tampón de lavado y el residuo de las células diana de la muestra. Por ejemplo, las células o los sustratos flotantes a los que están unidas las células se separan del tampón y el residuo a través de centrifugación. Después de la centrifugación, las células o sustratos forman un sedimento en el fondo del recipiente. El tampón y el residuo se decantan desde la parte superior.

Como ejemplo adicional, la mezcla se transfiere opcionalmente a (o se forma en) un recipiente cuyo fondo está formado por una membrana porosa. El tamaño de poro de la membrana se selecciona para que sea más pequeño que las células diana o los sustratos a los que están unidas las células pero lo suficientemente grande para permitir que la suciedad y otros materiales residuales pasen a través. Para eliminar los residuos, el aire o la presión del líquido se ajustan opcionalmente de tal manera que la presión sea mayor en el interior del recipiente que en el exterior, dirigiendo de este modo el tampón y el residuo fuera del recipiente mientras que la membrana retiene las células diana en el interior. El residuo también se puede eliminar, p. ej., filtrando el tampón y el residuo a través de la membrana impulsado por la fuerza de gravedad o por la fuerza centrífuga.

Como otro ejemplo adicional, las células se pueden inmovilizar en la superficie de un sustrato grande, p. ej., un porta o el fondo de un recipiente, a través de la fijación de células o la unión de afinidad utilizando proteínas de superficie. El tampón y el residuo se pueden eliminar directamente, o bien utilizando un vacío para la decantación desde la parte superior o bien volteando el recipiente boca abajo. Como otro ejemplo adicional, las células se inmovilizan opcionalmente sobre cuentas magnéticas, p. ej., o mediante fijación química o mediante unión de afinidad a proteínas de la superficie. Las cuentas se pueden inmovilizar a continuación en el recipiente anclando un campo

magnético al recipiente. Después se pueden eliminar el tampón y el residuo directamente sin la pérdida de las células de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo anterior. Como otro ejemplo adicional, se induce la migración de las sondas unidas no específicamente en el interior de las células fuera de las células por medio de métodos electroforéticos, mientras que las sondas unidas específicamente permanecen.

Como se ha establecido anteriormente, un ciclo de lavado se completa llevando a cabo una de las tres etapas anteriores, y el procedimiento de lavado se completa ejecutando uno o más (p. ej., varios) de tales ciclos de lavado. Se pueden utilizar diferentes tampones de lavado, técnicas de desprendimiento o eliminación de residuos en los diferentes ciclos de lavado.

Detección

En el presente tecnología, las células diana que tienen partículas generadoras de señal (marcas) que hibridan específicamente con dianas de ácido nucleico en ellas se pueden identificar entre una gran población heterogénea después de que se eliminen mediante lavado las sondas unidas no específicamente y otros residuos. Esencialmente, se puede emplear cualquier método conveniente para la detección y la identificación.

Específicamente, las células en suspensión se inmovilizan sobre un sustrato sólido después de la etapa de marcaje o de lavado descrita anteriormente. La detección se puede lograr utilizando aparatos basados en microscopio. Específicamente, en los casos en los que la señal generada por las sondas es luz quimioluminiscente, se puede utilizar un microscopio de formación de imágenes con una cámara CCD o un microscopio de barrido para convertir la señal luminosa en información digital. En los casos en que la sonda lleva una marca que emite una señal fluorescente, se puede utilizar para la detección un aparato basado en un microscopio de formación de imágenes fluorescentes o de barrido. Además, puesto que las células diana son, en general, raras entre una gran población de células, se pueden utilizar algoritmos de búsqueda automática de eventos para identificar y contar automáticamente el número de células diana en la población. Las células en suspensión se pueden inmovilizar sobre superficies sólidas mediante cualquiera de varias técnicas. Específicamente, se utiliza un recipiente con una gran superficie inferior plana para mantener la disolución con las células en suspensión. El recipiente se centrifuga a continuación para obligar a las células flotantes a depositarse en el fondo. Si la superficie es suficientemente grande en comparación con la concentración de células en la disolución, no es probable que las células se superpongan en la superficie del fondo. En la mayoría de los casos, incluso si las células se superponen, las células diana no lo harán ya que son relativamente raras en una población grande. En otra realización, las células suspendidas se someten a citocentrifugación sobre una superficie plana. Después de la eliminación de los fluidos, las células se inmovilizan sobre la superficie por la tensión superficial.

Preferiblemente, las células están flotando (en suspensión) o se inmovilizan sobre sustratos flotantes, tales como cuentas, de manera que los procedimientos de predetección, tales como la hibridación y el lavado, se pueden llevar a cabo eficazmente en disolución. Existen varios métodos para detectar células diana raras entre una gran población de células flotante. El método preferido consiste en utilizar un sistema de detección basado en el concepto de citometría de flujo, donde las células o los sustratos flotantes son hidrodinámicos y pasan por delante de la óptica de excitación y detección de uno por uno. Las células diana se identifican a través de la señal óptica emitida por las sondas unidas específicamente a las dianas de ácido nucleico en las células. La señal óptica puede ser, p. ej., luz luminiscente o fluorescente de una longitud de onda específica.

Ventajas

En resumen, la presente tecnología QMAGEX tiene varios elementos únicos que permiten la detección de ácido nucleico múltiplex en las células individuales y la detección de células diana. Estos elementos incluyen los siguientes.

Las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas en el interior de las células se utilizan como marcadores para la identificación de CTC (u otros tipos de células). En comparación con los marcadores basados en proteínas, los ácidos nucleicos son más estables, están ampliamente disponibles, y proporcionan una mejor razón de señal a ruido en la detección. Además, la técnica de detección se puede aplicar fácilmente a una amplia gama de tumores o incluso otras aplicaciones relacionadas con la identificación o clasificación de células. Como otra ventaja, las moléculas de ácido nucleico se miden de manera cuantificable a nivel de células individuales, en lugar de en una población de células mixtas. Esta característica asegura que la célula, como unidad funcional clave en el sistema biológico, es conservada para el estudio. En muchas aplicaciones que implican una población mixta de células, esta característica puede ser muy útil en la extracción de información útil, real del ensayo. (Por ejemplo, se puede identificar una CTC basándose en la detección de la presencia o el nivel o niveles de expresión de un conjunto de marcadores de ácido nucleico en la célula; la presencia o número de copias de ácidos nucleicos adicionales en la célula puede proporcionar a continuación información adicional útil en el diagnóstico, la predicción de resultados, o similares).

Las células permanecen opcionalmente en suspensión o en sedimentos que se pueden volver a suspender en todas las etapas del ensayo antes de la detección final. Esta característica mejora significativamente la cinética de ensayo, simplifica el procedimiento, mejora la reproducibilidad, y mantiene la célula en su correspondiente estado más

funcional. Por otro lado, los aspectos significativos de la invención, incluyendo la selección y el diseño de la sonda, la multiplexación, la amplificación y el marcaje, se pueden aplicar directamente a la técnica de hibridación in situ para la detección y enumeración de células raras en muestras de tejido.

Se emplea opcionalmente un enfoque de diseño único de sonda de captura indirecta para lograr una especificidad de hibridación con la diana excepcional, que da como resultado una mejor razón de señal a ruido en la detección.

Los ensayos permiten la detección de múltiples genes diana o múltiples parámetros en el mismo gen simultáneamente. Esta característica beneficia a la detección de células raras, tales como CTC de varias maneras. En primer lugar, puede reducir la tasa de falsos positivos, que es esencial en el diagnóstico del cáncer. En segundo lugar, puede proporcionar información adicional, clínicamente importante relacionada con la célula tumoral detectada, que puede incluir la fase de progreso y/o el tipo original y la fuente del tumor primario.

La tecnología de la invención incorpora un esquema de amplificación de la señal, lo que aumenta la sensibilidad de detección y permite la detección de células raras entre un gran número de células normales con alta confianza.

La detección se puede implementar en aparatos basados en FACS o citómetro de flujo o en plataformas basadas en microscopio. Los primeros pueden ser totalmente automáticos y proporcionan una detección rápida y la ventaja adicional de la clasificación de las células identificadas para su posterior estudio, si se desea. Esta última plataforma se encuentra más ampliamente disponible y tiene la ventaja de permitir la identificación manual final a través de la morfología.

Sistemas

En la presente memoria se describen sistemas y aparatos configurados para llevar a cabo los procedimientos de los nuevos ensayos. El aparato o sistema comprende uno o más (y preferiblemente todos) de al menos los siguientes elementos.

Manipulación de fluidos: El aparato incluye opcionalmente un subsistema que puede añadir reactivos, y si el ensayo lo requiere, decantar los fluidos desde el recipiente de muestra (p. ej., un recipiente extraíble o fijo, desechable o reutilizable, por ejemplo un tubo de muestra, una placa de múltiples pocillos, o similares). El subsistema se puede basar en un sistema de transferencia de fluido de tipo pipeta donde los diferentes fluidos son manipulados por un cabezal de la bomba con puntas desechables. Como ejemplo alternativo, cada reactivo puede tener su propio canal de fluido dedicado.

Mezcla y agitación: El aparato incluye opcionalmente un dispositivo para mezclar los diferentes reactivos en la disolución de muestra y promover que cualquier material unido no específicamente se separe de las células. El dispositivo puede tener un mecanismo para introducir un movimiento de vórtice o balanceo en el contendedor del recipiente de la muestra o acoplar sonido o ultrasonido al recipiente. Alternativamente, se puede colocar un agitador magnético en el recipiente de la muestra y se puede impulsar por una campo magnético giratorio producido por un elemento instalado en el contenedor del recipiente.

Control de la temperatura: La temperatura de la muestra se puede controlar a un nivel por encima de la temperatura ambiente mediante la instalación de un calentador y una sonda de temperatura en la cámara que contiene el recipiente de la muestra. Se puede utilizar un dispositivo Peltier para controlar la temperatura a un nivel por encima o por debajo de la ambiente. El control de temperatura es importante, p. ej., para el rendimiento de los procedimientos de hibridación y lavado en los ensayos.

Separación de las células y del fluido residual: El aparato incluye opcionalmente un dispositivo que puede eliminar el fluido residual de la mezcla de la muestra al tiempo que conserva las células para su análisis adicional. El dispositivo puede comprender un recipiente de la muestra que tiene una membrana porosa como parte inferior. El tamaño de poro de la membrana es más pequeño que las células pero más grande que el material residual de la solución mixta. El espacio entre la membrana se puede sellar y conectado a una bomba de vacío. Como ejemplo alternativo, el espacio por encima de la membrana se puede sellar y conectar a una fuente de presión positiva. En una realización diferente, el dispositivo puede comprender una centrifugadora. El recipiente con la parte inferior de membrana se carga en la centrifugadora, que centrifuga para forzar la filtración de la disolución de residuos a través de la membrana. En otra configuración de este dispositivo, el recipiente de la muestra tiene un fondo sólido. Las células se depositan en el fondo después de la centrifugación, y la disolución residual se decanta desde la parte superior mediante el subsistema de manipulación de fluidos descrito anteriormente.

Este dispositivo también puede realizar una función que prepara la muestra para la lectura final. En realizaciones en que la lectura es por medio de microscopía, las células se depositan típicamente y se unen a una superficie plana. Una centrífuga en el dispositivo puede lograr esto si la parte inferior del recipiente es plano. En otro enfoque, una placa plana puede girar dentro de su plano, y el sistema puede emplear el dispositivo de manipulación de fluido para hacer caer la disolución que contiene las células en el centro del giro. Las células se harán girar de manera uniforme sobre la superficie de la placa.

Detección: El elemento de detección del aparato de la invención se puede integrar con el resto del sistema, o

alternativamente se puede separada del resto de los subsistemas descritos anteriormente. En una realización, el dispositivo de lectura se basa en un microscopio, que puede ser un microscopio de formación de imágenes o de barrido. En otra realización, el dispositivo se basa en un microscopio de formación de imágenes fluorescentes o de barrido con múltiples longitudes de onda de excitación y de lectura para diferentes sondas. En una realización preferida, el dispositivo de lectura se basa en la citometría de flujo. Se prefiere el enfoque de la citometría porque puede leer directamente las células flotantes del fluido a múltiples longitudes de onda, mejorando así en gran medida la eficacia del ensayo.

Todos los elementos anteriores se pueden integrar en un aparato. Alternativamente, estos elementos se pueden incluir una serie de aparatos, que funcionan juntos como un sistema para realizar el ensayo. La Figura 10 ilustra una realización ilustrativa concreta de la configuración del aparato. En esta configuración concreta, la muestra se mantiene en un recipiente (tubo de ensayo de la muestra) con un fondo de membrana. Los reactivos se añaden desde la parte superior del tubo utilizando una bomba a través de una válvula multipuerto. Los residuos se retiran de la parte inferior mediante vacío. El contenedor para el recipiente de la muestra se fija sobre una mesa de agitación y se controla la temperatura del espacio alrededor de la muestra (zona temperatura controlada) por medio de un controlador de temperatura. El elemento de manipulación de fluidos puede introducir reactivos (reactivos de fijación y permeabilización, tampón de hibridación, conjuntos de sondas, y tampón de lavado) en el tubo de la muestra, eliminar los residuos del recipiente de residuos, e introducir células en un citómetro de flujo para su detección.

Se describe también un sistema que comprende un contenedor configurado para aceptar un recipiente de muestra; un controlador de temperatura configurado para mantener el recipiente de la muestra a una temperatura seleccionada (p. ej., una temperatura seleccionada por un usuario del sistema o una temperatura prefijada, opcionalmente se seleccionan temperaturas diferentes para diferentes etapas en un procedimiento de ensayo); un elemento de manipulación de fluidos conectado de forma fluida con el recipiente de la muestra y configurado para añadir fluido y/o extraer fluido del recipiente de la muestra; un elemento mezclador configurado para mezclar (p. ej., remover o agitar) el contenido del recipiente de la muestra; y un detector para detectar una o más señales del interior de las células individuales, en donde el detector está conectado opcionalmente de manera fluida con el recipiente de la muestra. Uno o más reservorios de fluido (p. ej., para los reactivos de fijación o permeabilización, el tampón de lavado, los conjuntos de sondas, y/o los residuos) están conectados opcionalmente de manera fluida al recipiente de la muestra.

Un sistema de la invención incluye opcionalmente un ordenador. El ordenador puede incluir un soporte lógico apropiado para recibir las instrucciones para el usuario, ya sea en forma de entrada del usuario en un conjunto de campos de parámetros, p. ej., en una IGU, o ya sea en forma de instrucciones preprogramadas, p. ej., preprogramadas para una variedad de diferentes operaciones específicas. El soporte lógico convierte opcionalmente estas instrucciones a un lenguaje apropiado para controlar el funcionamiento de los componentes del sistema (p. ej., para controlar un elemento de manipulación de fluidos y/o láser). El ordenador puede recibir también datos de otros componentes del sistema, p. ej., desde un detector, y puede interpretar los datos, proporcionarlos a un usuario en un formato legible por seres humanos, o utilizar esos datos para iniciar operaciones adicionales, de acuerdo con cualquier programación por el usuario.

Dianas de ácido nucleico

Como se ha indicado, una diana de ácido nucleico puede ser esencialmente cualquier ácido nucleico que se detecta deseablemente en una célula. La elección de las dianas dependerá obviamente de la aplicación deseada, p. ej., el análisis de la expresión, el diagnóstico de la enfermedad, la estadificación, o el pronóstico, la identificación o validación de la diana, el análisis de la ruta, el escrutinio de un fármaco, los estudios de eficacia de fármacos, o cualquiera de muchas otras aplicaciones. En la técnica se ha descrito un gran número de dianas adecuadas, y muchas más se pueden identificar utilizando mecanismos convencionales.

Para la detección de CTC, a modo solo de un ejemplo, se conoce una variedad de dianas de ácido nucleico adecuadas. Por ejemplo, un panel múltiplex de marcadores para la detección de CTC podría incluir uno o más de los siguientes marcadores: específico de células epiteliales (p. ej., CK19, Muc1, EpCAM), específico de células de la sangre como selección negativa (p. ej.,CD45), específico del origen tumoral (p. ej., PSA, PSMA, HPN para el cáncer de próstata y mam, mamb, her-2 para el cáncer de mama), específico del potencial de proliferación (p. ej., Ki-67, CEA, CA15-3), marcadores de apoptosis (p. ej., BCL-2, BCL-XL), y otros marcadores para cambios metastásicos genéticos y epigenéticos. Como ejemplo adicional, las dianas pueden incluir ARNm de HOXB13 y IL17BR, cuya proporción en el tumor primario se ha demostrado que pronostica el resultado clínico de pacientes con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno (Ma et al. (2004) "A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen" Cancer Cell 5(6):607-16 y Goetz et al. (2006) "A Two-Gene Expression Ratio of Homeobox 13 and Interleukin-17B Receptor for Prediction of Recurrence and Survival in Women Receiving Adjuvant Tamoxifen" Clin Cancer Res 12:2080-2087). Véanse también, p. ej., Gewanter, R. M., A. E. Katz, et al. (2003) "RT-PCR for PSA as a prognostic factor for patients with clinically localized prostate cancer treated with radiotherapy" Urology 61(5):967-71; Giatromanolaki et al. (2004) "Assessment of highly angiogenic and disseminated in the peripheral blood disease in breast cancer patients predicts for resistance to adjuvant chemotherapy and early relapse" Int J Cancer 108(4):620-7; Halabi et al. (2003) "Prognostic significance of reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate-specific antigen in metastatic prostate cancer: a nested study within CALGB 9583" J Clin

Oncol 21(3):490-5; Hardingham et al. (2000) "Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease" Int J Cancer 89(1):8-13; Hayes et al. (2002) "Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer" Int J Oncol 21(5):1111-7; Jotsuka, et al. (2004) "Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer" Surgery 135(4):419-26; Allen-Mersh T et al. (2003) "Colorectal cancer recurrence is predicted by RT-PCR detection of circulating cancer cells at 24 hours after primary excision" congreso ASCO, Chicago, Mayo de 2003; Shariat et al. (2003) "Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy" Cancer Res 63(18):5874-8; Smith et al. (2000) "Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques" J Clin Oncol 18(7):1432-9; Stathopoulou et al. (2002) "Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance" J Clin Oncol 20(16):3404-12; y Xenidis et al. (2003) "Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer" Ann Oncol 14(6):849-55.

Una clase preferida de dianas de ácido nucleico a detectar en los métodos de la presente invención son aquellas implicadas en el cáncer. Cualquier ácido nucleico que está asociado con el cáncer se puede detectar en los métodos de la invención, p. ej., aquellos que codifican factores de crecimiento polipeptídicos expresados en exceso o mutados (p. ej., SIS), receptores de factores de crecimiento expresados en exceso o mutados (por ejemplo, erb-B1), proteínas de transducción de señales expresadas en exceso o mutadas, tales como proteínas G (p. ej., Ras), o tirosina quinasas no receptoras (p. ej., abl), o proteínas reguladoras expresadas en exceso o mutadas (p. ej., *myc, myb, jun, fos*, etc.) y/o similares. En general, el cáncer a menudo puede estar relacionado con moléculas de transducción de señales y los correspondientes productos de oncogénicos, p. ej., ácidos nucleicos que codifican Mos, Ras, Raf y Met; y activadores y supresores de la transcripción, p. ej., p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, y/o receptores nucleares. p53, conocida coloquialmente como "policía molecular" de la célula, tiene una especial relevancia, ya que se pueden localizar una o varias lesiones genéticas en p53 en aproximadamente 50% de todos los cánceres conocidos.

Tomando una clase de genes que son relevantes para el cáncer como un ejemplo para la discusión, muchos receptores de hormonas nucleares se han descrito con detalle y se han elaborado los mecanismos por los que estos receptores pueden ser modificados para conferir actividad oncogénica. Por ejemplo, la base fisiológica y molecular de acción de la hormona tiroidea es revisada por Yen (2001) en "Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action" Physiological Reviews 81(3):1097-1142, y referencias allí. Los receptores nucleares conocidos y bien caracterizados incluyen aquellos para glucocorticoides (GR), andrógenos (AR), mineralocorticoides (MR), progestágenos (PR), estrógenos (ER), hormonas tiroideas (TR), vitamina D (VDR), retinoides (RAR y RXR), y receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) que se unen a eicosanoides. Los denominados "receptores nucleares huérfanos" son también parte de la superfamilia de receptores nucleares, y son estructuralmente homólogos a los receptores nucleares clásicos, tales como los receptores esteroideos y tiroideos. Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de estos receptores, o las formas oncogénicas de los mismos, pueden ser detectados en los métodos de la invención. Aproximadamente 40% de todos los tratamientos farmacéuticos disponibles actualmente son agonistas o antagonistas de los receptores nucleares y/o formas oncogénicas de los mismos, lo que subraya la importancia relativa de estos receptores (y sus ácidos nucleicos codificantes) como dianas para el análisis mediante los métodos de la invención.

Una clase ilustrativa de ácidos nucleicos diana es aquella que es diagnóstica del cáncer de colon, p. ej., en muestras derivadas de heces. El cáncer de colon es una enfermedad común que puede ser esporádica o hereditaria. La base molecular de los diversos patrones de cáncer de colon se conoce con algún detalle. En general, las mutaciones de la línea germinal son la base de los síndromes de cáncer de colon hereditario, mientras que una acumulación de mutaciones somáticas es la base de cáncer de colon esporádico. En judios Ashkenazi, una mutación que se había pensado previamente que era un polimorfismo puede causar cáncer de colon familiar. Las mutaciones de al menos tres clases diferentes de genes se han descrito en la etiología del cáncer de colon: oncogenes, genes supresores y genes con reparación de emparejamientos erróneos. Un ejemplo de ácido nucleico codifica DCC (suprimido en el cáncer de colon), una molécula de adherencia celular con homología con la fibronectina. Una forma adicional de cáncer de colon es un gen autosómico dominante, hMSH2, que comprende una lesión. La poliposis adenomatosa familiar es otra forma de cáncer de colon con una lesión en el locus MCC en el cromosoma número 5. Para obtener detalles adicionales sobre el cáncer de colon, véase, Calvert et al. (2002) "The Genetics of Colorectal Cancer" Annals of Internal Medicine 137(7): 603-612 y las referencias allí citadas. Para una variedad de cánceres de colon y marcadores de cáncer de colon que se pueden detectar en las heces, véase p. ej., Boland (2002) "Advances in Colorectal Cancer Screening: Molecular Basis for Stool-Based DNA Tests for Colorectal Cancer: A Primer for Clinicans" Reviews In Gastroenterological Disorders Volumen 2, Sup. 1 y las rerefencias allí citadas. Como con otros cánceres, las mutaciones en una variedad de genes diferentes que se correlacionan con el cáncer, tales como Ras and p53, son indicadores de diagnóstico útiles para el cáncer.

El cáncer de cuello uterino es otra diana ilustrativa para la detección, p. ej., mediante la detección de ácidos nucleicos que son diagnósticos de tal cáncer en muestras obtenidas a partir de secreciones vaginales. El cáncer cervical puede estar causado por el papopavirus (p. ej., virus del papiloma humano) y tiene dos oncogenes, E6 y E7.

E6 se une a p53 y lo elimina y E7 se une a PRB y lo elimina. La pérdida de p53 y la acción incontrolada de los factores de crecimiento E2F/DP sin la regulación de pRB es un mecanismo que conduce al cáncer de cuello uterino.

Otra diana ilustrativa para la detección mediante los métodos de la invención es el retinoblastoma, p. ej., en muestras derivadas de lágrimas. Retinoblastoma es un tumor de los ojos que resulta de la inactivación del gen pRB. Se ha encontrado que se transmite de manera hereditaria cuando un progenitor tiene un gen pRB mutado (y, por supuesto, la mutación somática puede causar formas no hereditarias de cáncer).

La Neurofibromatosis de Tipo 1 se puede detectar mediante los métodos de la invención. El gen NF1 es inactivado, lo que activa la actividad GTPasa del oncogén ras. Si falta NF1, ras es hiperactivo y causa tumores neurales. Los métodos de la invención se pueden utilizar para detectar la Neurofibromatosis de Tipo 1 en el LCR o por medio de muestreo de tejidos.

Se conocen muchas otras formas de cáncer y se pueden encontrar mediante la detección de las lesiones genéticas asociadas utilizando los métodos de la invención. Los cánceres que se pueden detectar por medio de la detección de la lesiones apropiadas incluyen cánceres de linfa, sangre, estómago, intestino, colon, testículos, páncreas, vejiga, cuello uterino, útero, piel, y esencialmente todos los otros para los que existe una lesión genética conocida. Para una revisión del tema, véase, p. ej., The Molecular Basis of Human Cancer Coleman and Tsongalis (Eds) Humana Press; ISBN: 0896036340; Primera edición (Agosto 2001).

Del mismo modo, se pueden detectar los ácidos nucleicos de organismos patógenos o infecciosos mediante los métodos de la invención, p. ej., para hongos infecciosos, p. ej., *Aspergillus*, o especies de *Candida*; bacterias, particularmente *E. coli*, que sirve de modelo para bacterias patógenas (y, por supuesto ciertas cepas de las cuales son patógenas), así como bacterias importantes desde el punto de vista médico tales como *Staphylococci* (p. ej., *aureus*), o *Streptococci* (p. ej., *pneumoniae*); protozoos tales como esporozoos (p. ej., *Plasmodia),* rizópodos (p. ej., *Entamoeba*) y flagelados (*Trypanosoma, Leishmania, Trichomonas, Giardia,* etc.); virus tales como virus de ARN(+) (los ejemplos incluyen Poxvirus, p. ej., *vaccinia*; Picornavirus, p. ej., *polio*; Togavirus, p. ej., *rubella*; Flavivirus, p. ej., VHC, y Coronavirus), virus de ARN(-) (p. ej., Rhabdovirus, p. ej., VSV; Paramyxovirus, p. ej., RSV; Orthomyxoviruses, p. ej., influenza; Bunyavirus y Arenavirus), virus de ADNdh (Reovirus, p. ej.), virus de ARN a ADN, es decir, Retrovirus, p. ej., VIH y HTLV, y determinados virus de ADN a ARN tales como hepatitis B.

Como se señaló anteriormente, los eventos de amplificación o de deleción génica se pueden detectar a nivel cromosómico utilizando los métodos de la invención, como se pueden detectar niveles de expresión alterados o anormales. Una clase preferida de dianas de ácido nucleico a detectar en los métodos de la presente memoria incluyen oncogenes o genes supresores de tumores sujetos a dicha amplificación o deleción. Las dianas de ácido nucleico ilustrativas incluyen, pero sin limitación, integrina (p. ej., deleción), tirosina quinasas receptoras (RTK; p. ej., amplificación, mutación puntual, translocación, o aumento de la expresión), NF1 (p. ej., deleción o mutación puntual), Akt (p. ej., amplificación, mutación puntual, o aumento de la expresión), PTEN (p. ej., deleción o mutación puntual), MDM2 (p. ej., amplificación), SOX (p. ej., amplificación), RAR (p. ej., amplificación), CDK2 (p. ej., amplificación o aumento de la expresión), Ciclina D (p. ej., amplificación o translocación), Ciclina E (p. ej., amplificación), Aurora A (p. ej., amplificación o aumento de la expresión), P53 (p. ej., deleción o mutación puntual), NBS1 (p. ej., deleción o mutación puntual), Gli (p. ej., amplificación o translocación), Myc (p. ej., amplificación o mutación puntual), HPV-E7 (p. ej., infección viral), y VPH-E6 (p. ej., infección viral).

Para realizaciones en que se utiliza un ácido nucleico diana como una referencia, los ácidos nucleicos de referencia adecuados se han descrito en la técnica o se pueden determinar de manera similar. Por ejemplo, se conoce en la técnica una variedad de genes cuyo número de copias se mantiene de manera estable en diversas células tumorales. Los genes constitutivos cuyos transcritos pueden servir como referencias en los análisis de expresión génica incluyen, por ejemplo, 18S rRNA, 28S rRNA, GAPD, ACTB, y PPIB. Se han descrito en la técnica ácidos nucleicos similares adicionales y pueden adaptarse a la práctica de la presente invención.

Marcas

Se conoce en la técnica una amplia variedad de marcas y se puede adaptar a la práctica de la presente invención. Por ejemplo, se han descrito marcas luminiscentes y marcas 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.

Como otro ejemplo, son bien conocidas en la técnica diversas marcas fluorescentes, incluyendo, pero sin limitación, fluoróforos hidrófobos (p. ej., ficoeritrina, rodamina, Alexa Fluor 488 y fluoresceína), proteína fluorescente verde (GFP) y variantes de la misma (p. ej., proteína fluorescente cian y proteína fluorescente amarilla), y puntos cuánticos. Véase, p. ej., The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Décima Edición o Edición Web (2006) de Invitrogen (disponible en la Red en probes.invitrogen.com/handbook), para obtener descripciones de fluoróforos que emiten a diferentes diferente longitudes de onda (incluyendo productos conjugados en tándem de fluoróforos que pueden facilitar la excitación y la detección simultáneas de múltiples especies marcadas). Para el uso de puntos cuánticos como marcas para las biomoléculas, véanse, p. ej., Dubertret et al. (2002) Science 298:1759; Nature Biotechnology (2003) 21:41-46; y Nature Biotechnology (2003) 21:47-51 .

Las marcas se pueden introducir en moléculas p. ej. polinucleótidos, durante la síntesis o mediante reacciones postsintéticas mediante mecanismos establecidos en la técnica. Por ejemplo, los kits para el marcaje fluorescente de polinucleótidos con diferentes fluoróforos están disponibles de Molecular Probes, Inc. ((www). Molecularprobes.com), y las fosforamiditas que contiene fluoróforo para su uso en la síntesis de ácido nucleico están disponibles en el mercado. Del mismo modo, las señales de las marcas (p. ej., la absorción y/o emisión de fluorescencia a partir de una marca fluorescente) se pueden detectar esencialmente mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la detección multicolor y similares son bien conocidos en la técnica. Los aparatos para la detección de marcas son igualmente bien conocidos y ampliamente asequibles, p. ej., escáneres, microscopios, citómetros de flujo, etc. Por ejemplo, los citómetros de flujo son ampliamente asequibles, p. ej., de Becton-Dickinson ((www.) Bd.com) y Beckman Coulter ((www.) beckman.com).

Técnicas de biologíca molecular

Al poner en práctica la presente invención, se utilizan opcionalmente muchas técnicas convencionales en la biología molecular, la microbiología y la tecnología de ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican, por ejemplo, en Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA; Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000 y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (complementado en 2006). Otras referencias útiles, p. ej. para el aislamiento y el cultivo celular (p. ej., para el posterior aislamiento del ácido nucleico) incluyen Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias allí citadas; Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamborg y Phillips (Eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlín Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (Eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Elaboración de polinucleótidos

Los métodos de elaboración de ácidos nucleicos (p. ej., mediante amplificación in vitro, purificación a partir de células, o síntesis química), los métodos para la manipulación de ácidos nucleicos (p. ej., mediante digestión con enzimas de restricción, ligación, etc.) y los diversos vectores, líneas celulares y similares útiles en la manipulación y elaboración de ácidos nucleicos se describen en las referencias anteriores. Además, los métodos de elaboración de polinucleótidos ramificados (p. ej., multímetros de amplificación) se describen en los documentos USPN 5.635.352, USPN 5.124.246, USPN 5.710.264, y USPN 5.849.481, así como en otras referencias mencionadas anteriormente.

Además, se puede encargar esencialmente cualquier polinucleótido (incluyendo, p. ej., polinucleótidos marcados o biotinilados) a la medida o estándar de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company ((www.) Mcrc.com), The Great American Gene Company ((www.) genco.com), ExpressGen Inc. ((www.) expressgen.com), Qiagen (oligos.qiagen.com) y muchos otros.

Se pueden introducir opcionalmente en un polinucleótido una marca, biotina, u otro radical, ya sea durante o después de la síntesis. Por ejemplo, se puede incorporar una biotina-fosforamidita durante la síntesis química de un polinucleótido. Alternativamente, se puede biotinilar cualquier ácido nucleico utilizando mecanismos conocidos en la técnica; los reactivos adecuados están disponibles en el mercado, p. ej., de Pierce Biotechnology ((www). piercenet.com). Del mismo modo, se puede marcar con fluorescencia cualquier ácido nucleico, por ejemplo, mediante el uso de kits disponibles en el mercado, tales como los de Molecular Probes, Inc. ((www). Molecularprobes.com) o Pierce Biotechnology ((www). Piercenet.com) o mediante la incorporación de una fosforamidita marcada con fluorescencia durante la síntesis química de un polinucleótido.

Referencias:

Hess CJ, et al. Gene expression profiling of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia by novel multiplex-PCR-based method. Leukemia. Diciembre de 2004;18(12):1981-8.

Vogel I et al. Detection and prognostic impact of disseminated tumor cells in pancreatic carcinoma. Pancreatology. 2002;2(2):79-88.

Gilbey AM et al. The detection of circulating breast cancer cells in blood. J Clin Pathol. Septiembre de 2004;57(9):903-11.

Molnar B et al. Molecular detection of circulating cancer cells. Role in diagnosis, prognosis and follow-up of colon cancer patients. Dig Dis. 2003;21(4):320-5.

Vlems FA et al. Detection and clinical relevance of tumor cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer. Anticancer Res. Enero-Febrero de 2003;23(1B):523-30.

Ma PC et al Circulating tumor cells and serum tumor biomarkers in small cell lung cancer. Anticancer Res. Enero-Febrero de 2003;23(1A):49-62.

Mocellin S et al (2004) Molecular detection of circulating tumor cells in an independent prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanoma. Int J Cancer 111:741-745

Cristofanilli M. et al., (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med. 19 de Agosto de 2004;351(8):781-91.

Ito S et al., (2002) Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with the real-time RT-PCR on a Light Cycler, Cancer Letters, 183:195-203.

Hicks DG et al., In situ hybridization in the pathology laboratory: General principles, automation, and emerging research applications for tissue-based studies of gene expression. J Mol Histol. Agosto de 2004;35(6):595-601.

Herzenberg LA et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. Clin Chem. Octubre de 2002;48(10):1819-27.

Timm EA Jr et al. Amplification and detection of a Y-chromosome DNA sequence by fluorescence in situ polymerase chain reaction and flow cytometry using cells in suspension. Cytometry. 15 de Septiembre de 1995;22(3):250-5.

Bauman JG, Bentvelzen P. Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent in situ hybridization. Cytometry. Nov. 1988;9(6):517-24.

Timm EA Jr, Stewart CC. Fluorescent in situ hybridization en suspension (FISHES) using digoxigenin-labeled probes and flow cytometry. Biotechniques. Marzo de 1992;12(3):362-7.

Bains MA Flow cytometric quantitation of sequence-specific mRNA in hemopoietic cell suspensions by primer-induced in situ (PRINS) fluorescent nucleotide labeling. Exp Cell Res. Sept. 1993;208(1):321-6.

Patterson BK Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven in situ hybridization and flow cytometry. Science. 14 de Mayo de 1993;260(5110):976-9.

Rufer N Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. Nat Biotechnol. Agosto de 1998;16(8):743-7.

Hultdin M Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. Nucleic Acids Res. 15 de Agosto de 1998;26(16):3651-6.

Fava TA, et al Ectopic expression of guanylyl cyclase C in CD34+ progenitor cells in peripheral blood. J Clin Oncol. 1 de Octubre de 2001;19(19):3951-9.

Kosman D, Mizutani CM, Lemons D, Cox WG, McGinnis W, Bier E. Multiplex detection of RNA expression in Drosophila embryos. Science. 6 de Agosto de 2004;305(5685):846.

Player AN, Shen LP, Kenny D, Antao VP, Kolberg JA. Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization. J Histochem Cytochem. Mayo de 2001;49(5):603-12.

Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science. 26 de Julio de 1996;273(5274):494-7.

Larsson C, Koch J, Nygren A, Janssen G, Raap AK, Landegren U, Nilsson M. In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. Nat Methods. 2004 Dec;1(3):227-32. Epub 18 de Noviembre de 2004.

Kenny D, Shen L-P, Kolberg J. Detection of Viral Infection and Gene Expression in Clinical Tissue Specimens using Branched DNA (bDNA) In Situ Hybridisation. J. Histochem. Cytochem. 2002, 50(9): 1219-1227.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de uno o más ácidos nucleicos diana en una célula individual, comprendiendo el método:

proporcionar una muestra que comprende una célula, y dicha célula comprende, o se sospecha que comprende, uno o más ácidos nucleicos diana;

fijar y permeabilizar la célula;

para cada ácido nucleico diana, proporcionar

(i) una o más sondas marcadoras, en las que cada sonda marcadora comprende una o más marcas,

(ii) una o más sondas marcadoras y uno o más amplificadores, en los que cada sonda marcadora comprende una o más marcas y en los que cada amplificador es capaz de hibridar con una o más sondas marcadoras, o

(iii) una o más sondas marcadoras, uno o más amplificadores y uno o más preamplificadores, en los que cada sonda marcadora comprende una o más marcas, en los que cada amplificador es capaz de hibridar con una o más sondas marcadoras y en los que cada preamplificador es capaz de hibridar con uno o más amplificadores;

para cada ácido nucleico diana, proporcionar dos o más sondas de captura diferentes, en las que cada una de las dos o más sondas de captura comprende una sección T complementaria a una sección en el ácido nucleico diana y una sección L complementaria a una sección en la sonda marcadora, o en un amplificador o en un preamplificador, y en las que las secciones T son complementarias a regiones no solapantes del ácido nucleico diana y las secciones L son complementarias a regiones no solapantes del ácido nucleico diana, el amplificador o el preamplificador;

hibridar, en la célula, las dos o más sondas de captura con una sola copia del ácido nucleico diana, cuando está presente en la célula;

capturar la sonda marcadora con las dos o más sondas de captura, capturando de este modo la sonda marcadora con el ácido nucleico diana hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia de la sonda marcadora, o hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia del amplificador e hibridando las sondas marcadoras con el amplificador; o hibridando simultáneamente al menos dos sondas de captura diferentes con una sola copia del preamplificador e hibridando el uno o más amplificadores con el preamplificador y la una o más sondas marcadoras con cada uno de los uno o más amplificadores; y

detectar una señal de la marca.

2. El método de la reivindicación 1, en el que las dos o más sondas de captura diferentes hibridan con secciones únicas y adyacentes en el ácido nucleico diana.

3. El método de la reivindicación 1, en el que se realiza la hibridación de las dos o más sondas de captura diferentes con la única copia de la sonda marcadora, amplificador o preamplificador a una temperatura de hibridación que es mayor que la temperatura de fusión T_m de la sección L de cada sonda de captura individual que se une a la sonda marcadora, amplificador o preamplificador.

4. El método de la reivindicación 3, en el que se realiza la hibridación de las dos o más sondas de captura diferentes con la única copia del ácido nucleico diana a una temperatura de hibridación que es menor que la temperatura de fusión T_m de la sección T de cada sonda de captura individual que se une al ácido nucleico diana.

5. El método de la reivindicación 1, en el que se realiza la hibridación de las dos o más sondas de captura con la única copia del ácido nucleico diana a una temperatura de hibridación que es mayor que la temperatura de fusión T_m de la sección T de cada sonda de captura individual que se une al ácido nucleico diana.

6. El método de la reivindicación 5, en el que se realiza la hibridación de las dos o más sondas de captura diferentes con la única copia de la sonda marcadora, amplificador o preamplificador a una temperatura de hibridación que es menor que la temperatura de fusión T_m de la sección L de cada sonda de captura individual que se une a la sonda marcadora, amplificador o preamplificador.

7. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente proporcionar una o más sondas de bloqueo capaces de hibridar con regiones del ácido nucleico diana no ocupadas por las sondas de captura.

8. El método de la reivindicación 1, en el que se logra cada etapa de hibridación o captura para todos los ácidos nucleicos diana a la vez.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más ácidos nucleicos diana se seleccionan independientemente del grupo consistente en un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un

ARN ribosómico, un ácido nucleico endógeno de la célula y un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno.

10. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más ácidos nucleicos diana comprenden un primer ácido nucleico diana que comprende una primera región de un ARNm y un segundo ácido nucleico diana que comprende una segunda región del mismo ARNm.

11. El método de la reivindicación 1, en el que el uno o más ácidos nucleicos diana comprenden un ácido nucleico de referencia, y en el que el método comprende normalizar la señal del uno o más ácidos nucleicos diana a la señal del ácido nucleico de referencia.

12. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de correlacionar la intensidad de la señal de cada ácido nucleico diana con la cantidad del ácido nucleico diana correspondiente presente en la célula.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra que comprende la célula deriva de un fluido corporal o de sangre.

14. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende una sección de tejido.

15. El método de la reivindicación 1, en el que la célula está en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección.

16. El método de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula tumoral circulante.

17. El método de la reivindicación 1, en el que cada sonda de captura está en configuración “Z”.

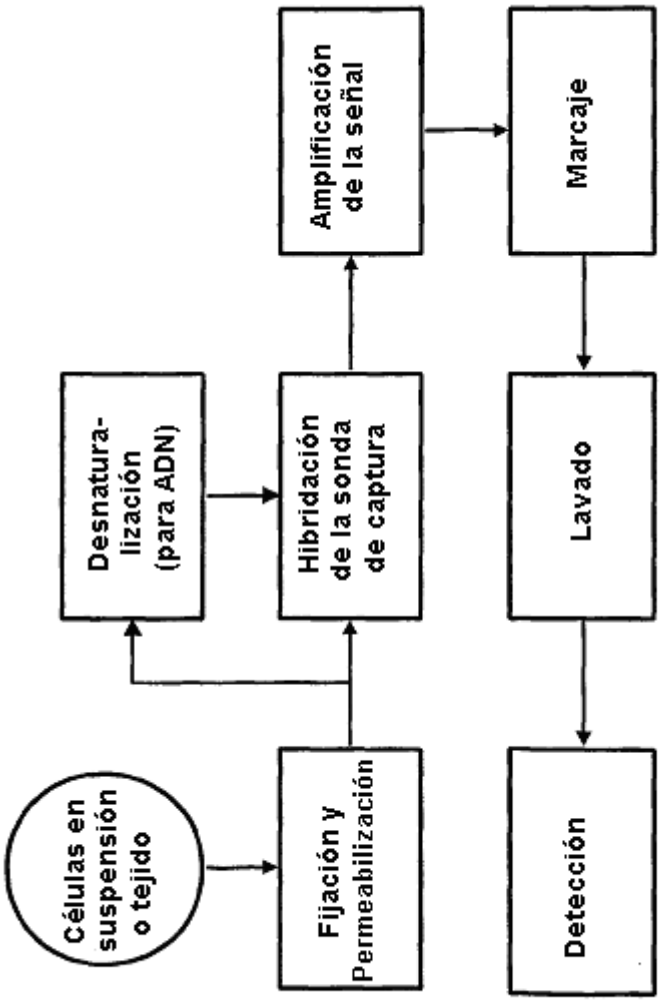
Células en suspensión o tejido
Fijación y Permeabilización
Desnatura-lización (para ADN)
Hibridación de la sonda de captura
Amplificación de la señal
Detección
Lavado
Marcaje

Fig. 1

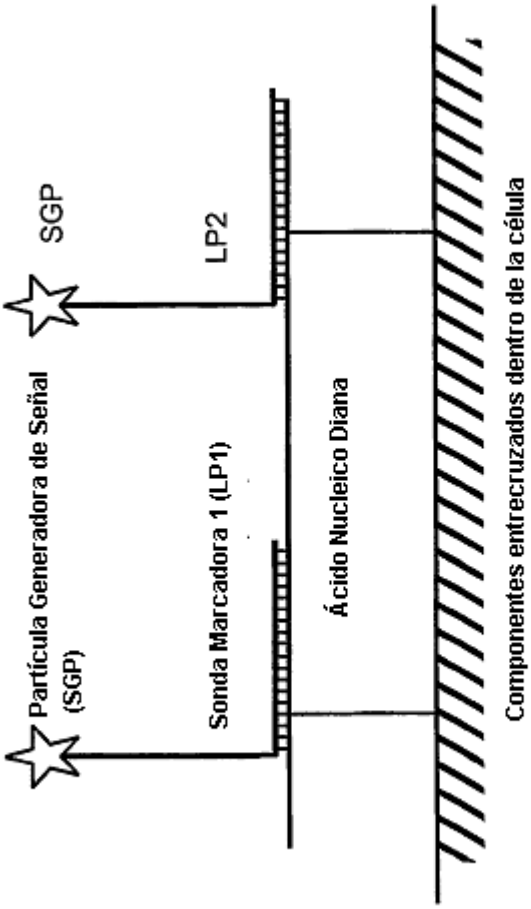
Partícula Generadora de Señal (SGP)
SGP
Sonda Marcadora 1 (LP1)
LP2
Ácido Nucleico Diana
Componentes entrecruzados dentro de la célula

Fig. 2

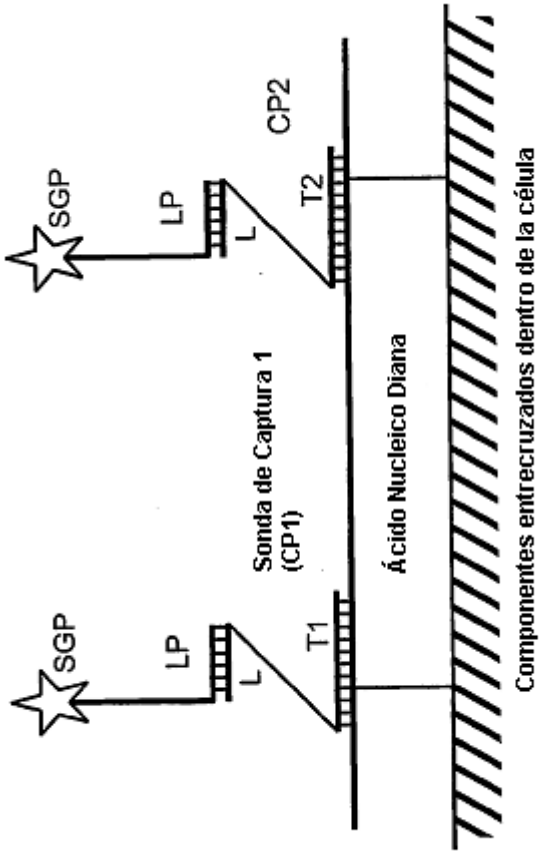
SGP
LP
L
T1
Sonda de Captura 1
(CP1)
SGP
LP
L
T2
CP2
Ácido Nucleico Diana
Componentes entrecruzados dentro de la célula

Fig. 3

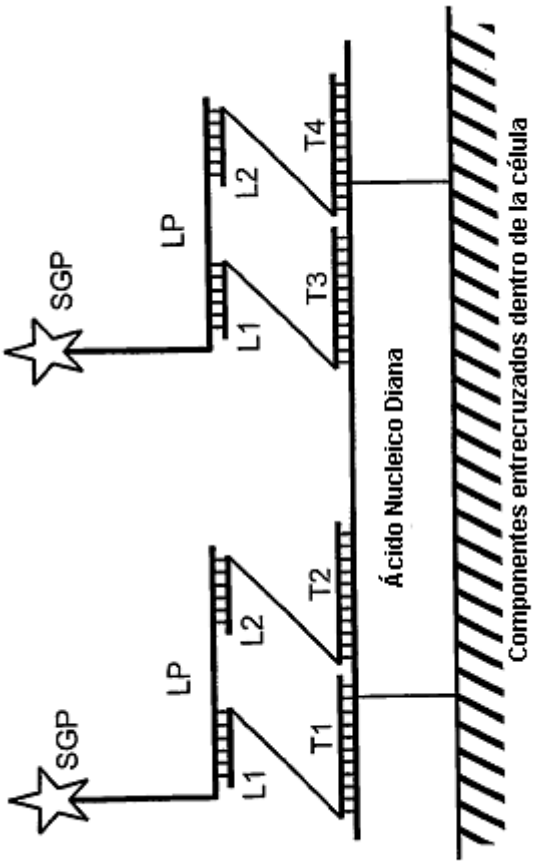
SGP
LP
L1
L2
T1
T2
SGP
LP
L1
L2
T3
T4
Ácido Nucleico Diana
Componentes entrecruzados dentro de la célula

Fig. 4

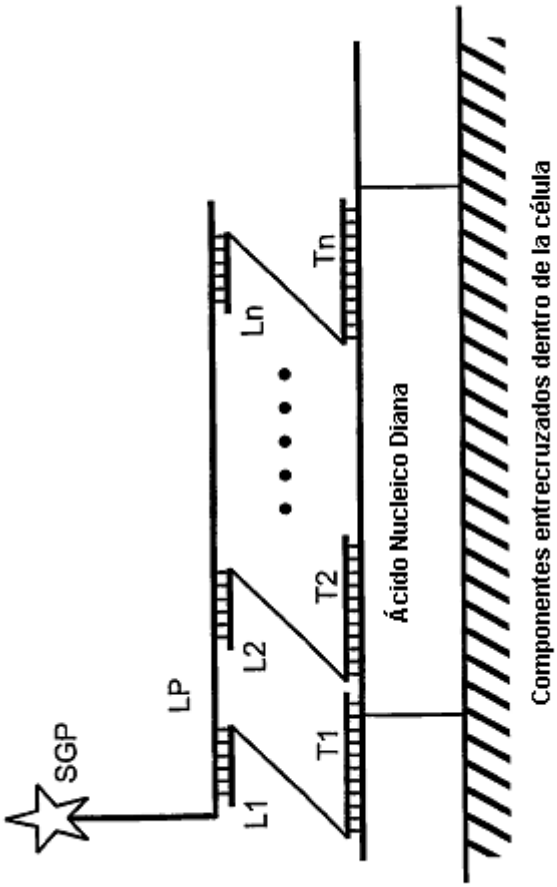
SGP
LP
L1
L2
Ln
T1
T2
Tn
Ácido Nucleico Diana
Componentes entrecruzados dentro de la célula

Fig. 5

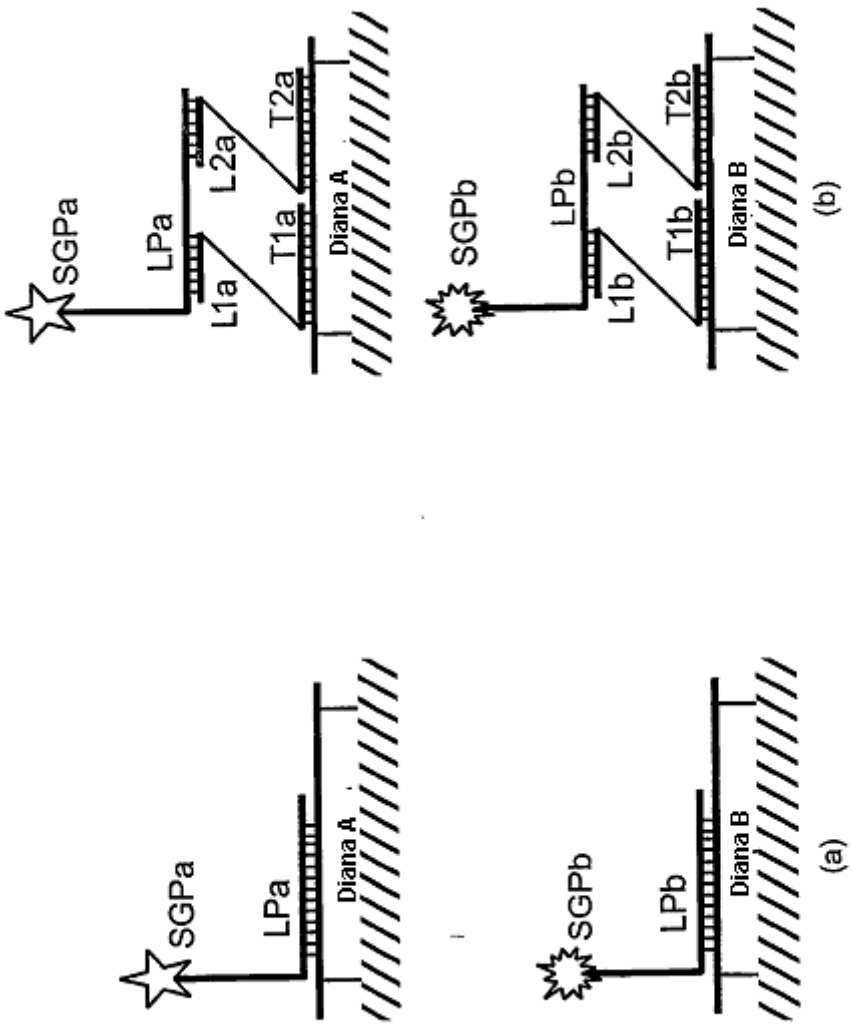
SGPa
LPa
Diana A
(a)
SGPb
LPb
Diana B
SGPa
LPa
L1a
L2a
T1a
T2a
Diana A
SGPb
LPb
L1b
L2b
T1b
T2b
Diana B
(b)

Fig. 6

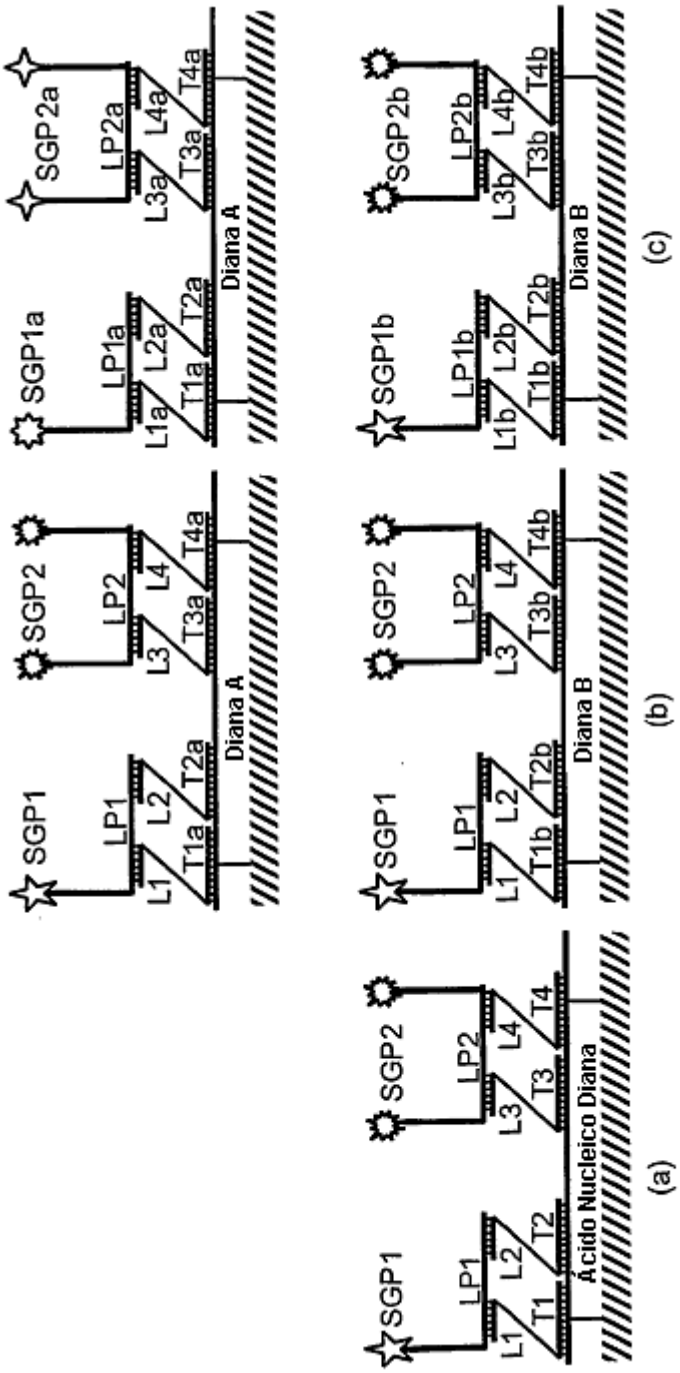
SGP1
LP1
L1
L2
T1
T2
SGP2
LP2
L3
L4
T3
T4
Ácido Nucleico Diana
(a)
SGP1
LP1
L1
L2
T1b
T2b
SGP2
LP2
L3
L4
T3b
T4b
Diana B
(b)
SGP1a
LP1a
L1a
L2a
T1a
T2a
SGP2a
LP2a
L3a
L4a
T3a
T4a
Diana A
SGP1
LP1
L1
L2
T1a
T2a
SGP2
LP2
L3
L4
T3a
T4a
Diana A
SGP1b
LP1b
L1b
L2b
T1b
T2b
SGP2b
LP2b
L3b
L4b
T3b
T4b
Diana B
(c)

Fig. 7

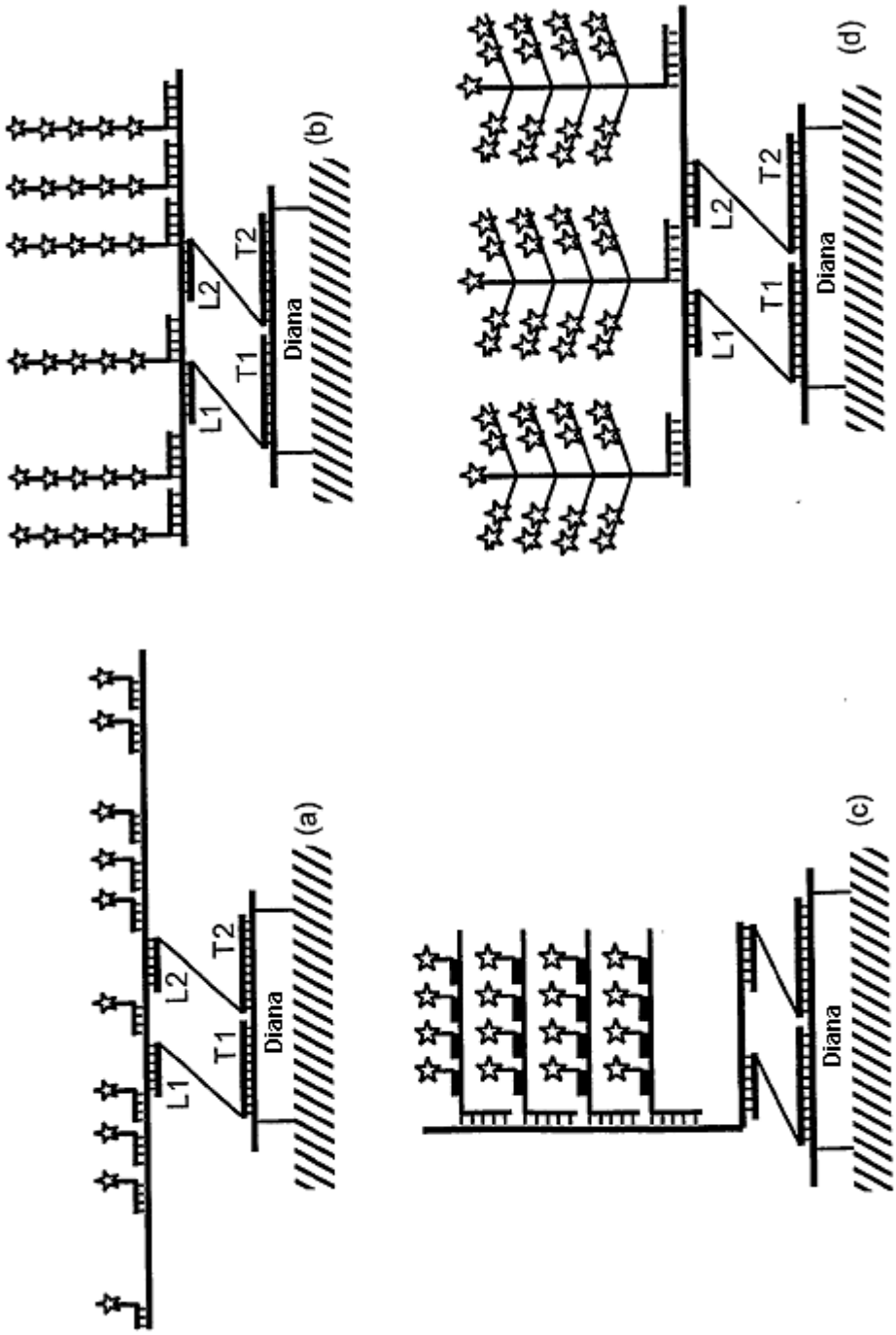

Fig. 8

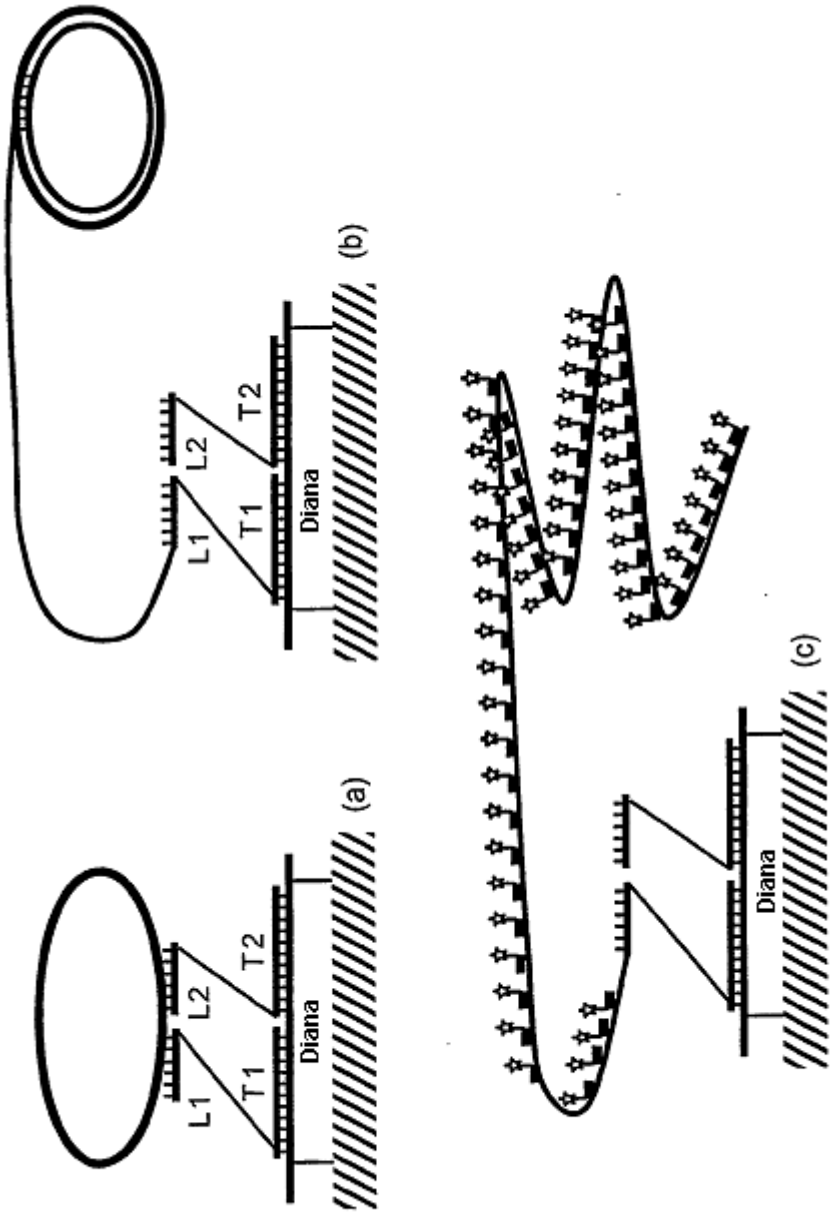

Fig. 9

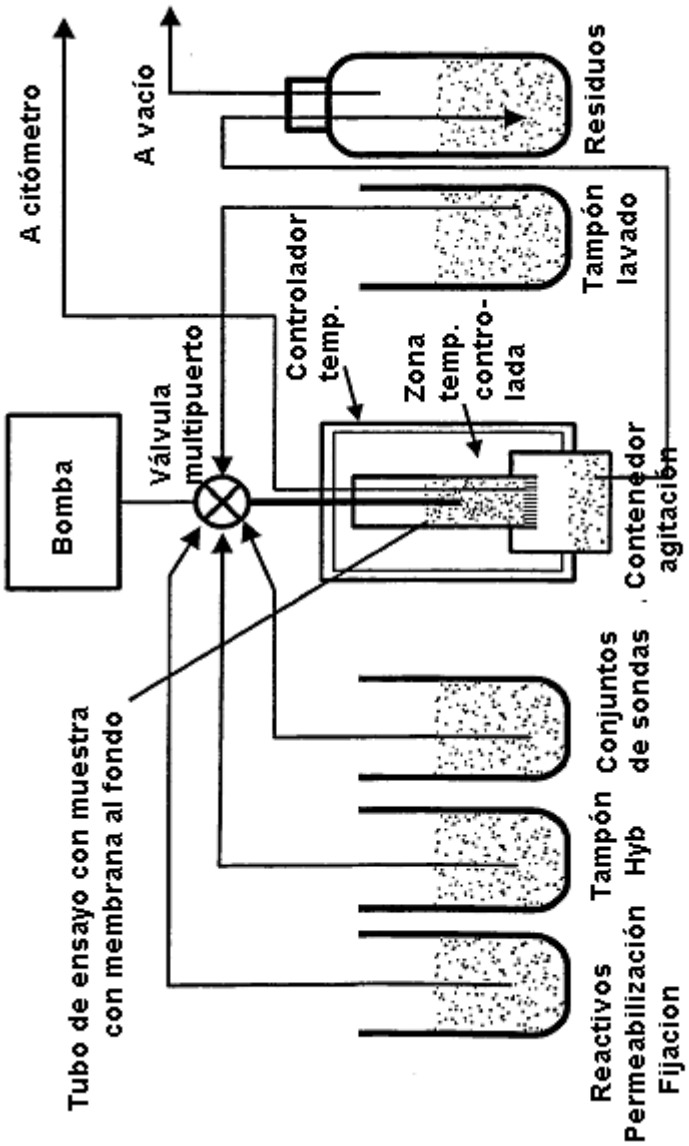
A citómetro
A vacío
Residuos
Tampón lavado
Controlador temp.
Zona temp. contro-lada
Válvula multipuerto
Bomba
Contenedor agitación
Conjuntos de sondas
Tampón Hyb
Reactivos Permeabilización Fijacion
Tubo de ensayo con muestra con membrana al fondo

Fig. 10