

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 398**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2007 PCT/US2007/012130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2007 WO07139766**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2007 E 07795152 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2030011**

54 Título: **Sistemas y métodos para analizar nanoindicadores**

30 Prioridad:

**22.05.2006 US 802862 P**

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

**28.06.2017**

73 Titular/es:

**NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)  
201 ELLIOT AVENUE WEST, SUITE 300  
SEATTLE, WA 98119, US**

72 Inventor/es:

**HWANG, JENQ-NENG y  
MITTON, JEFFREY, D.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 620 398 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**

Sistemas y métodos para analizar nanoindicadores

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisoria US N.º 60/802.862 presentada el 22 de mayo de 2006, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para la detección y la cuantificación de moléculas diana individuales en muestras biomoleculares. En particular, la invención se refiere a moléculas indicadoras marcadas, codificadas, denominadas en la presente “nanoindicadores” marcados, que son capaces de unirse a moléculas diana individuales. A través de los códigos de las etiquetas de los nanoindicadores, la unión de los nanoindicadores a moléculas diana da por resultado la identificación de moléculas diana. También se proporcionan métodos para la preparación y el uso de tales nanoindicadores. Los nanoindicadores pueden ser usados para diagnóstico, pronóstico, control de calidad y aplicaciones de cribado.

**2. Antecedentes de la invención**

15 Aunque todas las células en el cuerpo humano contienen el mismo material genético, los mismos genes no son activos en todas estas células. Alteraciones en los modelos de expresión génicos pueden tener efectos profundos sobre las funciones biológicas. Estas variaciones en la expresión de los genes se encuentran en el núcleo de los procesos fisiológicos y patológicos alterados. Por lo tanto, la identificación y cuantificación de la expresión de los genes en células normales en comparación con las células enfermas puede ayudar al descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas y diagnósticas.

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

25 Esta técnica, denominada hibridación molecular, ha sido una herramienta útil para identificar y analizar secuencias de ácidos nucleicos específicas en mezclas complejas. Esta técnica ha sido usada en diagnóstico, por ejemplo, para detectar secuencias de ácidos nucleicos de varios microbios en muestras biológicas. Adicionalmente, las técnicas de hibridación han sido usadas para mapear diferencias genéticas o polimorfismos entre individuos. Además, estas técnicas han sido usadas para monitorear cambios en la expresión génica en diferentes poblaciones de células o en células tratadas con diferentes agentes.

30 En el pasado, sólo se podían detectar algunos pocos genes en una muestra compleja de una sola vez. En la década anterior, diversas tecnologías hicieron posible monitorear el nivel de expresión de un gran número de transcritos dentro de una célula de una sola vez (ver, por ejemplo, Schena et al, 1995, Science 270: 467-470; Lockhart et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 1675-1680; Blanchard et al, 1996, Nature Biotechnology 14: 1649). En organismos para los cuales se conoce la mayor parte o todo el genoma, es posible analizar los transcritos de un gran número de los genes dentro de la célula. La mayoría de estas tecnologías emplean micromatrices de ADN, dispositivos que consisten en miles de secuencias de ADN inmovilizadas presentes en una superficie miniaturizada que han hecho a este proceso más eficiente. Usando una micromatriz, es posible en un solo experimento detectar la presencia o ausencia de miles de genes en una muestra biológica. Esto permite a los investigadores realizar simultáneamente varios tests de diagnóstico en una muestra, u observar cambios de nivel de expresión en miles de genes en un experimento. En general, las micromatrices son preparadas uniendo las secuencias de ADN a una superficie tal como una membrana de nylon o una diapositiva de vidrio en ubicaciones definidas con precisión en una rejilla. Luego los ácidos nucleicos en una muestra biológica son marcados e hibridados a la matriz. La muestra de ADN marcada etiqueta la posición exacta en la matriz en donde ocurre la hibridación, permitiendo la detección automática.

45 Lamentablemente, a pesar de la miniaturización de los formatos de matrices, este método aún requiere cantidades significativas de la muestra biológica. Sin embargo, en varios casos, tales como biopsias de tejidos enfermos o muestras de un tipo de célula discreto, la muestra biológica se encuentra en una cantidad limitada. Adicionalmente, la cinética de hibridación en la superficie de una micromatriz es menos eficiente que la hibridación en pequeñas cantidades de solución acuosa. Además, si bien existen métodos para estimar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra en base al resultado de la hibridación de la micromatriz, la tecnología de micromatrices hasta ahora no permite la detección de moléculas diana a un nivel individual, ni hay allí métodos basados en micromatrices para cuantificar directamente la cantidad de molécula diana en una muestra dada.

Por lo tanto, existe una necesidad de poder realizar una detección, identificación y cuantificación exacta y sensible de moléculas diana en mezclas complejas.

55 El comentario o la cita de una referencia en la presente no deben ser interpretados como una admisión de que tal referencia es técnica anterior a la presente invención.

**3. Síntesis de la invención**

5 Un primer aspecto de la invención proporciona un método para detectar la presencia de una sonda en una muestra colocada sobre un sustrato, en donde la sonda comprende una pluralidad de etiquetas ubicadas espacialmente, en donde una primera etiqueta en la pluralidad de etiquetas está asociada con una primera posición en el sustrato que emite luz en un primer intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda y una segunda etiqueta en la pluralidad de etiquetas está asociada con una segunda posición en el sustrato que emite luz en un segundo intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda. El método comprende:

10 identificar una pluralidad de etiquetas, en una pluralidad de imágenes de luz, que están próximas entre sí en el sustrato, en donde un orden espacial de la pluralidad de etiquetas determina una secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas, en donde cada imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz es para luz recibida de la muestra a un intervalo de longitud de onda en una pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda; y

determinar si la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas comprende una secuencia indicadora válida, en donde cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas es confirmada como una secuencia indicadora válida, se considera que la pluralidad de etiquetas es la sonda; y

15 cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas no es confirmada como una secuencia indicadora válida, se considera que la pluralidad de etiquetas no es la sonda.

20 En algunas realizaciones, la etapa determinante comprende comparar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas con secuencias indicadoras válidas en una tabla de referencia. En algunas realizaciones, el método comprende además almacenar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas que no es confirmada como una secuencia indicadora válida. Por ejemplo, la secuencia de cadenas puede ser almacenada en una memoria electrónica. En algunas realizaciones, el método comprende además alinear una primera imagen de luz con una segunda imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz usando una pluralidad de etiquetas de referencia presentes en el sustrato.

25 En algunas realizaciones, la etapa de identificar una pluralidad de etiquetas se repite una pluralidad de veces. Cada vez que se repite la etapa de identificar una pluralidad de etiquetas, se identifica una pluralidad de etiquetas diferente, en la pluralidad de imágenes de luz, que se encuentran próximas entre sí en el sustrato. En algunas realizaciones, el método comprende además determinar si cada una de las diferentes pluralidades de etiquetas comprende una secuencia indicadora válida. Se considera que cada pluralidad de etiquetas diferente es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la diferente pluralidad de etiquetas es confirmada como una secuencia indicadora válida. Además, se considera que cada diferente pluralidad de etiquetas no es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la diferente pluralidad de etiquetas no es confirmada como una secuencia indicadora válida. En algunos casos de acuerdo con esta realización de la presente invención, se identifica una pluralidad de sondas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se identifican dos o más sondas, tres o más sondas, diez o más sondas, al menos 5, 10, 15, 20, 50, 75, 30 100, 150, 200, 300 ó 400 sondas o más.

35 En algunas realizaciones en donde se identifica una pluralidad de sondas, se registra cada tipo de sonda identificada. Un "tipo" de sonda es identificado por la secuencia de cadenas de la sonda. Cada secuencia de cadenas válida única representa un tipo de sonda diferente. En algunas realizaciones, cada secuencia de cadenas de cada diferente pluralidad de etiquetas que no es confirmada como una secuencia indicadora válida es almacenada. De este modo, es posible determinar condiciones comunes que surgen en el sustrato. Un tipo de condición que puede ser identificado rastreando pluralidades de etiquetas que no forman secuencias de cadenas válidas es la condición en donde hay demasiadas sondas en el sustrato. Cuando hay demasiadas sondas en el sustrato, las etiquetas de las sondas vecinas están próximas entre sí, haciendo que sea difícil determinar a qué sonda pertenece cada etiqueta. Otro tipo de condición que puede ser identificado es la condición en la cual un número excesivo de sondas no tienen una longitud completa. En algunas realizaciones, todas las especies de etiquetas, cadenas, las secuencias indicadoras no válidas, las secuencias indicadoras válidas, los tipos de sonda, son rastreados en los métodos de la presente invención.

40 Otro aspecto de la presente invención proporciona un producto de programa informático, en donde el producto del programa informático comprende un medio de almacenamiento que se puede leer en el ordenador y un mecanismo de programa informático incorporado en éste, el mecanismo del programa informático está adaptado para llevar a cabo un método para detectar la presencia de una sonda dentro de una muestra colocada sobre un sustrato de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde el mecanismo del programa informático comprende:

45 un módulo de almacenamiento de datos que comprende instrucciones para almacenar la pluralidad de imágenes de luz; un módulo de identificación de etiqueta que comprende instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas; y un módulo de identificación de sondas, que comprende instrucciones para determinar si la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas comprende la secuencia indicadora válida.

55 En algunas realizaciones, una primera etiqueta en la pluralidad de etiquetas está asociada con una primera posición en el sustrato que emite luz en un primer intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud

de onda. Además, una segunda etiqueta en la pluralidad de etiquetas está asociada con una segunda posición en el sustrato que emite luz en un segundo intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda. En algunas realizaciones, una parte del primer intervalo de longitud de onda se superpone con una parte del segundo intervalo de longitud de onda. En algunas realizaciones, ninguna parte del primer intervalo de longitud de onda se superpone con una parte del segundo intervalo de longitud de onda. En algunas realizaciones, cada etiqueta en la pluralidad de etiquetas está asociada con una posición en el sustrato que emite más de una cantidad de luz umbral en una imagen de luz cualquiera en la pluralidad de imágenes de luz.

En algunas realizaciones, el mecanismo del programa informático comprende además una tabla de referencia que comprende una pluralidad de secuencias indicadoras válidas. En tales realizaciones, el módulo de identificación de sondas comprende además instrucciones para comparar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas con las secuencias indicadoras válidas en la tabla de referencia. En algunas realizaciones, la tabla de referencia está dimensionada y configurada para alojar hasta  $4^4$ , hasta  $7^4$ , o hasta  $20^{20}$  diferentes secuencias indicadoras válidas.

En algunas realizaciones, el módulo de identificación de sondas comprende además instrucciones para almacenar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas que no es confirmada como una secuencia indicadora válida. En algunas realizaciones, el módulo de almacenamiento de datos comprende además instrucciones para alinear una primera imagen de luz con una segunda imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz usando una pluralidad de etiquetas de referencia presentes en el sustrato. En algunas realizaciones, la posición de la sonda en el sustrato es aleatoria. En algunas realizaciones, la sonda consiste en una sola molécula. En algunas realizaciones, la sonda comprende un andamio molecular y cada etiqueta en la pluralidad de etiquetas representa una posición diferente en el andamio molecular. En algunas realizaciones, cada posición en el andamio molecular que está representada por una etiqueta es separada de una posición vecina en el andamio por un espaciador. En algunas realizaciones, la sonda comprende un andamio de ácido ribonucleico o de ácido desoxinucleico de una sola hebra y cada etiqueta en la pluralidad de etiquetas está representada por una secuencia de ácido ribonucleico o de ácido desoxinucleico de una sola hebra cargado con colorante que se hibrida con una posición diferente en el andamio.

En algunas realizaciones, la sonda comprende un andamio molecular que tiene un primer extremo y un segundo extremo. Una secuencia específica de la diana está unida en forma covalente al primer extremo. Una secuencia ligadora está unida en forma covalente al segundo extremo. En tales realizaciones, la sonda está ordenada linealmente sobre el sustrato a través de (i) la unión de la secuencia específica de la diana a una primera entidad molecular que está unida a una primera posición del sustrato y (ii) la unión de la secuencia ligadora a una segunda entidad molecular que está unida a una segunda posición en el sustrato. En algunas realizaciones, la primera entidad molecular es un complejo diana (ácido ribonucleico o ácido desoxinucleico de hebra simple)-biotina y la segunda entidad molecular es un complejo predeterminado (ácido ribonucleico o ácido desoxinucleico de hebra simple)-biotina.

En algunas realizaciones, el módulo de identificación de la etiqueta comprende además instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas candidata en la pluralidad de imágenes de luz. Esta pluralidad de etiquetas es un subconjunto de la pluralidad de etiquetas candidata que han sido validadas por el módulo de identificación de la etiqueta. En algunas realizaciones, cada etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas candidata está asociada con una posición en el sustrato que emite más de una cantidad umbral de luz en una imagen de luz cualquiera en la pluralidad de imágenes de luz. En algunas realizaciones, la pluralidad de etiquetas comprende una primera etiqueta candidata que está asociada con una primera posición en el sustrato que emite luz en un primer intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda y una segunda etiqueta candidata que está asociada con una segunda posición en el sustrato que emite luz en un segundo intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda. En algunas realizaciones, una parte del primer intervalo de longitud de onda se superpone con una parte del segundo intervalo de longitud de onda. En algunas realizaciones, el primer intervalo de longitud de onda no se superpone con el segundo intervalo de longitud de onda. En algunas realizaciones, las instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas aplica un primer criterio de distancia entre un centroide de una primera etiqueta candidata y un centroide de una segunda etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas candidata. El primer criterio de distancia puede ser determinado por una distancia calculada entre una primera etiqueta y una segunda etiqueta en la sonda. En algunas realizaciones, las instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas aplica un segundo criterio de distancia entre un centroide de la segunda etiqueta candidata y un centroide de una tercera etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas candidata. El segundo criterio de distancia puede ser determinado por una distancia calculada entre una segunda etiqueta y una tercera etiqueta en la sonda. En algunos casos, el primer criterio de distancia es el mismo que el segundo criterio de distancia. En otros casos, el primer criterio de distancia es diferente del segundo criterio de distancia. En algunas realizaciones, un valor del primer criterio de distancia y un valor del segundo criterio de distancia contribuyen a determinar si la pluralidad de etiquetas es la sonda.

En algunas realizaciones, el mecanismo del programa informático comprende además una tabla de referencia que comprende una pluralidad de secuencias indicadoras válidas. En algunas realizaciones, cada secuencia indicadora válida en la pluralidad de secuencias indicadoras válidas comprende una primera distancia entre un primer par de etiquetas y una segunda distancia entre un segundo par de etiquetas. Además, el módulo de identificación de la sonda comprende instrucciones para comparar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas, el primer criterio de distancia, y el segundo criterio de distancia, a secuencias indicadoras válidas en la tabla de referencia.

- 5 En algunas realizaciones, las instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas aplica un criterio de ángulo a tripletes de etiquetas candidatas en la pluralidad de etiquetas candidatas. En algunas realizaciones, las instrucciones para identificar a la pluralidad de etiquetas comprende instrucciones para aplicar un modelo (por ejemplo, regresión lineal) para seleccionar etiquetas candidatas en la pluralidad de etiquetas candidatas. En algunas realizaciones, el módulo de identificación de la etiqueta comprende además instrucciones para verificar que una etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas candidatas satisface un criterio en forma de mancha. Un ejemplo de un criterio en forma de mancha es una concordancia entre una forma de mancha observada de la etiqueta candidata y la dispersión del punto teórico de la fuente puntual de luz limitada por difracción determinada por una ampliación de la etiqueta candidata. En algunas realizaciones, las instrucciones para verificar que una etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas candidatas satisface el criterio de forma de mancha comprende instrucciones para realizar el modelado de la función de dispersión del punto en la etiqueta candidata. En algunas realizaciones, las instrucciones para verificar que una etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas candidatas satisface el criterio de la forma de mancha comprende instrucciones para aplicar un algoritmo de segmentación de la mancha a la etiqueta candidata. En algunas realizaciones, el algoritmo de segmentación de la mancha comprende una transformación "watershed".
- 10
- 15 En algunas realizaciones, las instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas aplica un criterio de distancia absoluto entre un centroide de una primera etiqueta candidata terminal y un centroide de una segunda etiqueta candidata terminal en la pluralidad de etiquetas candidatas. En algunas realizaciones, las instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas comprende instrucciones para identificar una zona tamponante alrededor de una parte del sustrato que tiene etiquetas candidatas seleccionadas en la pluralidad de etiquetas candidatas, en donde no hay etiquetas candidatas en la zona tamponante. En algunas realizaciones, la pluralidad de etiquetas está ordenada linealmente en el sustrato (por ejemplo, en la misma orientación lineal). En algunas realizaciones, una orientación lineal de cada etiqueta en la pluralidad de etiquetas es predeterminada (por ejemplo, por una aplicación de una corriente eléctrica a través del sustrato o por una aplicación de un fluido a través del sustrato, etc.). En algunas realizaciones, cada etiqueta respectiva en la pluralidad de etiquetas ocupa entre 4 y 20 píxeles, entre 1 y 30 píxeles, o entre 4 y 100 píxeles en una representación pixelada de la etiqueta respectiva en una imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz.
- 20
- 25
- 30 En algunas realizaciones, el módulo de identificación de la etiqueta comprende además instrucciones para identificar una primera etiqueta candidata en la pluralidad de imágenes de luz e instrucciones para identificar una segunda etiqueta candidata en la pluralidad de imágenes de luz que se encuentra dentro de una distancia predeterminada alejada de la primera etiqueta candidata. En tales realizaciones, la pluralidad de etiquetas comprende la primera etiqueta candidata y la segunda etiqueta candidata.
- 35
- 40 En algunas realizaciones, la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda comprende entre dos diferentes intervalos de longitud de onda y seis diferentes intervalos de longitud de onda, o entre dos diferentes intervalos de longitud de onda y veinte diferentes intervalos de longitud de onda. En algunas realizaciones, la pluralidad de etiquetas comprende cuatro o cinco etiquetas. En algunas realizaciones, la pluralidad de etiquetas comprende entre dos etiquetas y veinte etiquetas.
- 45
- 50 En algunas realizaciones, un primer subconjunto de las etiquetas en la secuencia de cadenas controla un error de identidad de las etiquetas en un segundo subconjunto de las etiquetas en la secuencia de cadenas. En algunas realizaciones, un primer subconjunto de etiquetas en la secuencia de cadenas es una suma de control para un segundo subconjunto de etiquetas en la secuencia de cadenas.
- 55
- 60 En algunas realizaciones, el módulo de identificación de la etiqueta comprende instrucciones para repetir las instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas una pluralidad de veces. Cada vez que se repiten las instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas, se identifica una diferente pluralidad de etiquetas, en la pluralidad de imágenes de luz, que se encuentran próximas entre sí en el sustrato. El módulo de identificación de sonda determina si cada una de las diferentes pluralidades de etiquetas identificadas por el módulo de identificación de etiquetas comprende una secuencia indicadora válida. Para cada diferente pluralidad de etiquetas identificada, el módulo de identificación de sonda considera que la diferente pluralidad de etiquetas es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la diferente pluralidad de etiquetas es confirmada como una secuencia indicadora válida y considera que la diferente pluralidad de etiquetas no es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la diferente pluralidad de etiquetas no está confirmada como una secuencia indicadora válida. En algunas realizaciones, se identifica una pluralidad de sondas. En algunas realizaciones, la pluralidad de sondas consiste en tres o más sondas. En algunas realizaciones, la pluralidad de sondas consiste en diez o más sondas. En algunas realizaciones, la pluralidad de sondas consiste en menos de 50 sondas.
- 65
- 70 En algunas realizaciones, el módulo de identificación de sonda almacena cada tipo de sonda identificada. En algunas realizaciones, el modelo de identificación de sonda almacena cada secuencia de cadenas de cada diferente pluralidad de etiquetas que no está confirmada como una secuencia indicadora válida. En algunas realizaciones, el modelo de identificación de sonda almacena cada secuencia de cadenas de cada diferente pluralidad de etiquetas que es confirmada como una secuencia indicadora válida.
- 75
- 80 Otro aspecto de la invención proporciona un sistema informático para detectar la presencia de una sonda dentro de una muestra colocada sobre un sustrato, en donde la sonda comprende una pluralidad de etiquetas ordenadas

espacialmente, en donde una primera etiqueta en la pluralidad de etiquetas está asociada con una primera posición en el sustrato que emite luz en un primer intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda y una segunda etiqueta en la pluralidad de etiquetas está asociada con una segunda posición en el sustrato que emite luz en un segundo intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda.

5 El sistema informático comprende:

una unidad de procesamiento central; y

una memoria, acoplada a la unidad de procesamiento central, la memoria almacena un módulo de almacenamiento de datos, un módulo de identificación de etiquetas y un módulo de identificación de etiquetas por lo que el sistema informático está adaptado para realizar un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención;

10 el módulo de almacenamiento de datos comprende instrucciones para almacenar la pluralidad de imágenes de luz;

el módulo de identificación de etiquetas comprende instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas; y

un módulo de identificación de sondas comprende instrucciones para determinar si la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas comprende la secuencia indicadora válida.

15 Otro aspecto de la invención proporciona un sistema que comprende este sistema informático y un mecanismo de medición de luz que mide la pluralidad de imágenes de luz. En algunas realizaciones, el sistema comprende además un mecanismo de iluminación que ilumina el sustrato. En algunas realizaciones, el mecanismo de iluminación comprende una fuente de luz de excitación y una pluralidad de filtros de excitación. Cada filtro de excitación en la pluralidad de filtros de excitación es usado en una imagen de luz correspondiente en la pluralidad de imágenes de luz para confinar la fuente de luz a un intervalo espectral diferente correspondiente cuando se mide la imagen de luz correspondiente. En algunas realizaciones, el mecanismo de medición de luz comprende una pluralidad de filtros de longitud de onda de medición, en donde cada filtro de longitud de onda de medición en la pluralidad de filtros de longitud de onda de medición se usa en una imagen de luz correspondiente en la pluralidad de imágenes de luz para rechazar luz que no está dentro de un intervalo espectral correspondiente. En algunas realizaciones, el mecanismo de medición de luz comprende un fotodetector que forma una señal de detección en respuesta a luz emitida de la muestra.

20 En algunas realizaciones, el mecanismo de medición de luz comprende un circuito detector dirigido por la señal de detección que mide luz emitida de la muestra colocada sobre el sustrato. En tales realizaciones, el mecanismo de medición de luz comprende además una memoria electrónica para almacenar una pluralidad de posiciones de etiqueta, en donde cada posición de etiqueta en la pluralidad de posiciones de etiqueta representa una etiqueta y cada posición de etiqueta en la pluralidad de posiciones de etiqueta origina más de una cantidad umbral de luz. En algunas realizaciones, el mecanismo de identificación de etiquetas identifica la pluralidad de etiquetas que están próximas entre sí de entre la pluralidad de posiciones de etiqueta almacenadas en la memoria electrónica. En algunas realizaciones, el mecanismo de identificación de etiquetas comprende instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas candidatas en la pluralidad de imágenes de luz y la pluralidad de etiquetas es un subconjunto de la pluralidad de etiquetas candidatas.

#### 4. Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-1F. La Figura 1A ilustra un nanoindicador dual con un código de nanoindicador de 16 posiciones, usando dos componentes de nanoindicador de 8 posiciones. La Figura 1B ilustra un nanoindicador dual con un código de nanoindicador de 9 posiciones, usando un componente de nanoindicador de 8 posiciones y un componente de nanoindicador de una sola posición. La Figura 1C ilustra un nanoindicador dual con un código de nanoindicador de 8 posiciones, usando una sonda fantasma y un componente de nanoindicador de 8 posiciones. La Figura 1D ilustra un nanoindicador único con un código de nanoindicador de 8 posiciones. En las Figuras 1A-1D, la forma de estrella (ilustrada con una flecha) es ilustrativa de una etiqueta de afinidad, que se puede usar para purificar el nanoindicador o inmovilizar al nanoindicador (o al complejo de nanoindicador-molécula diana) con el propósito de toma de imágenes. La región numerada en las Figuras 1A-1D se refiere a regiones de unión de etiquetas separadas. Todas, excepto la posición 12 de la Figura 1A están marcadas con uno a cuatro tipos de monómeros de etiquetas, ilustrados como diagramas grises, blancos, tramados o tipo "sol" con rayas. La posición 12 de la Figura 1A es un "punto oscuro" no marcado. Las Figuras 1E y 1F representan variaciones en los nanoindicadores de las Figuras 1B y 1D, respectivamente, en donde la molécula diana a la cual están unidos los nanoindicadores comprende partes de biotina (mostradas como pequeños asteriscos), por ejemplo nucleótidos modificados con biotina incorporados aleatoriamente en un ácido nucleico diana. Los nanoindicadores propiamente dichos comprenden además opcionalmente una etiqueta de afinidad (no mostrada).

Figuras 2A-2C. La Figura 2A muestra una ilustración de una unidad de etiqueta de un nanoindicador, que contiene un andamio con unidades de parche y aletas divididas correspondientes dispuestas a lo largo de su longitud. La Figura 2B ilustra los componentes de un solo par de conexiones y su aleta correspondiente, que contiene: 1: una parte de un andamio de nanoindicador (por ejemplo, M13 ADN de una sola hebra); 2: Un par de conexiones; 3: un par de aletas divididas; y 4: oligonucleótidos marcados, cada uno con un monómero de etiqueta incorporado, hibridado a la aleta dividida. La Figura 2C muestra un nanoindicador con 4 "manchas", cada mancha diseñada para contener 9 pares de

conexiones de 60-65 nucleótidos, cada uno unido a un par de aletas divididas de 95-100 nucleótidos. Cada par de aletas divididas tenía un sitio de unión para 12 oligonucleótidos, cada uno unido a un monómero de una sola etiqueta. Cada mancha tenía por lo tanto sitios de unión para 108 monómeros de etiqueta.

5 Figura 3. Un nanoindicador en el cual las conexiones que son segmentos de ARN pueden ser usadas con (Figura 3A) y sin registros (Figura 3B). Ambas Figuras 3A y 3B ilustran un (1) andamio de nanoindicador (línea negra pesada) al cual están unidos (2) ocho segmentos de ARN (líneas 1-8), (3) una secuencia específica de la diana (línea de puntos "T") y (4) un oligonucleótido (línea a cuadros "O") que es parcialmente complementaria al andamio nanoindicador y parcialmente complementaria a la secuencia específica de la diana. Este oligonucleótido es denominado un oligonucleótido "ligador". En la Figura 3A, sólo está marcado un registro, es decir, cada segmento de ARN alternado. 10 Las segundas posiciones del registro sirven como "espaciadores", haciendo posible generar un código de nanoindicador en donde posiciones consecutivas en el código son del mismo "color", o espectralmente indistinguibles. En la Figura 3B, ambos registros, es decir, segmentos de ARN adyacentes sin espaciadores intervinientes, están marcados, sin un vecino más cercano del mismo "color".

15 Figura 4. Es una imagen de un nanoindicador dual hibridado a una molécula diana. Aquí, ambos registros están marcados. Los nanoindicadores están marcados con tres diferentes colores, Alexa 488, Cy3 y Alexa 647 (marcados 1,2 y 3, respectivamente). Los paréntesis izquierdos muestran una sonda del nanoindicador dual y los paréntesis derechos muestran la otra sonda del nanoindicador dual. Los colores 1, 2 y 3 fueron adquiridos cada uno en diferentes canales y el primero y el segundo registros, que se ven como una fila de manchas, fueron desviados hacia arriba por varios píxeles para poder mostrar cada registro individualmente.

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

25 Figuras 6A-6E. La Figura 6A es una ilustración esquemática del experimento mostrado en las Figuras 6B y 6C. En este caso, la estrella representa la biotina que se usó para unir el complejo por un extremo a la superficie antes del estiramiento. Las Figuras 6B y 6C muestran imágenes de experimentos en donde la sonda fantasma S2-A, el nanoindicador marcado S2-B y el ADN diana S2 (Figura 6B) o el ARN diana S2 (Figura 6C) fueron hibridados. La Figura 6E muestra un primer plano de un complejo de nanoindicador de la Figura 6B, conteniendo cada uno una sonda fantasma S2-A, un nanoindicador marcado S2-B y un ADN diana S2. La Figura 6D muestra una imagen de un experimento control negativo, en donde la sonda fantasma S2-A, el nanoindicador marcado S2-B y ningún ARN diana S2 fueron hibridados. 30

35 Figuras 7A-G. Las Figuras 7A, 7B, 7C y 7D ilustran diferentes permutaciones de conexiones en un andamio de nanoindicador, las Figuras 7E y 7F ilustran diferentes permutaciones de aletas divididas en un andamio de nanoindicador, opcionalmente hibridadas a uno o más oligonucleótidos, como en la Figura 7G. En la Figura 7A-G, a se refiere a una molécula 5' o 3' o el extremo de una molécula, y p se refiere a una molécula 3' o 5' correspondiente o un extremo de una molécula.

40 Figura 8. La Figura 8 ilustra un esquema en el cual un fago M13 de hebra simple es linealizado para usar como un andamio de nanoindicador. El fago circular M13 es reasociado a un exceso de cinco veces el oligonucleótido cortador BamHI (líneas tramadas) (1), y el M13 parcialmente de doble hebra resultante es digerido con la endonucleasa de restricción BamHI (2), dando por resultado un M13 linealizado en el cual el oligonucleótido cortador BamHI aún está unido (3). Este complejo de M13-oligonucleótido es calentado en presencia de un exceso de oligonucleótido complementario al oligonucleótido cortador BamHI (un "oligonucleótido anti-BamHI") (líneas grises) (4). El oligonucleótido cortador BamHI se reasocia con el exceso de oligonucleótido anti-BamHI y la molécula M13 es purificada a partir del oligonucleótido, por ejemplo, usando columnas de exclusión de tamaño, para dar el andamio M13. 45

Figura 9. La Figura 9 ilustra un sistema informático de acuerdo con una realización de la presente invención.

50 Figuras 10A-10C. La Figura 10A muestra un nanoindicador marcado que contiene una sola etiqueta de afinidad, A1. Otra etiqueta de afinidad, A2, puede ser unida al nanoindicador por unión directa del nanoindicador a una molécula que contiene A2 (por ejemplo, si el nanoindicador es o comprende un ácido nucleico, puede hibridarse directamente con otro ácido nucleico al cual A2 está unido), como se ilustra en la Figura 10B. Alternativamente, la segunda etiqueta de afinidad, A2, puede ser unida al nanoindicador marcado a través de una molécula puente, tal como el ácido nucleico puente ("X") ilustrado en la Figura 10C.

55 Las Figuras 11A-11B ilustran un nanoindicador marcado (a base de ácido nucleico) con una etiqueta de afinidad, A1, en un extremo. En la Figura 11, el nanoindicador marcado es inmovilizado a través de la unión de A1 a un compañero de afinidad inmovilizado. El otro extremo del nanoindicador se encuentra en solución (Figura 11A), pero puede ser inmovilizado por hibridación a un oligonucleótido complementario que contiene otra etiqueta de afinidad (A2) usada para inmovilizar al nanoindicador (Figura 11B). A1 y A2 pueden ser iguales, por ejemplo biotina, para la inmovilización

sobre una superficie recubierta con avidina o estreptavidina. Después de la inmovilización de A1, el nanoindicador puede ser estirado, o “elongado” como se ilustra en la Figura 11, por ejemplo por electroestiramiento, para la separación de las regiones de unión de la etiqueta de una manera que permite la detección del código del nanoindicador. Opcionalmente, mientras el nanoindicador se encuentra en un estado elongado, A2 es introducido y une el extremo del nanoindicador que es complementario a A2 hacia abajo a la superficie.

Figuras 12A-12B. La Figura 12A proporciona una ilustración de un nanoindicador que comprende una primera parte inmovilizada F1; y la Figura 12B proporciona una ilustración de un nanoindicador extendido en un campo eléctrico y comprendiendo una primera parte inmovilizada F1 y una segunda parte inmovilizada F2, en donde F2 es inmovilizada a través de un complejo con la molécula F3.

Figuras 13A-13C. La Figura 13 A proporciona una ilustración de un complejo de tres miembros para la inmovilización de un nanoindicador extendido; la Figura 13B proporciona una ilustración de un complejo de dos miembros para la inmovilización de un nanoindicador extendido; y la Figura 13C proporciona una ilustración de un complejo incompleto para la inmovilización de un nanoindicador extendido.

Figuras 14A-14D. La Figura 14A proporciona una ilustración de un nanoindicador que comprende una primera parte inmovilizada F1; la Figura 14B proporciona una ilustración de un nanoindicador inmovilizado en la primera parte F1 y en la segunda parte a través de complejos con F2; la Figura 14C proporciona una ilustración de un nanoindicador que comprende una primera parte inmovilizada a una superficie a través de biotina; y la Figura 14D proporciona una ilustración de un nanoindicador extendido inmovilizado en una primera parte y en una segunda parte a través de la unión selectiva de biotina a una superficie de avidina.

Figuras 15A-15C. La Figura 15A ilustra la inmovilización de un extremo de una molécula de ADN en un dispositivo microfluídico; la Figura 15B ilustra la extensión del ADN en un campo eléctrico; y la Figura 15C ilustra la inmovilización selectiva de un segundo extremo de la molécula de ADN extendida.

La Figura 16 proporciona una imagen de nanoindicadores extendidos inmovilizados selectivamente por los métodos de la presente invención.

## 5. Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere a nanoindicadores, y a su producción y uso. Un nanoindicador completamente ensamblado comprende dos porciones principales, una secuencia específica de la diana que tiene la capacidad de ligarse a una molécula diana, y una región etiquetada que emite un “código” de señales (el “código del nanoindicador”) asociado con la secuencia específica de la diana. Al tener lugar la ligación del nanoindicador a la molécula diana, el código del nanoindicador identifica la molécula diana a la que está ligado el nanoindicador.

Los nanoindicadores son estructuras modulares. En términos generales, un nanoindicador es una entidad molecular que contiene tres elementos básicos: un andamio que contiene dos o más regiones de fijación de etiquetas, uno o más parches fijados al andamio, y una secuencia específica de la diana, también fijada al andamio. Los elementos de un nanoindicador pueden hallarse en una única entidad molecular (un nanoindicador “singular”), o en dos entidades moleculares (un nanoindicador “dual”). Cada entidad molecular puede estar compuesta de una molécula o por más de una molécula fijadas entre sí mediante medios covalentes o no covalentes. En términos generales, cada componente de un nanoindicador dual tiene una secuencia específica de la diana que se liga a un sitio diferente en la misma molécula diana. Esto permite utilizar componentes de nanoindicador más pequeños con cinéticas más eficientes para la ligación del nanoindicador a la molécula diana y mejores relaciones señal/ruido resultantes de la mayor especificidad de ligación.

Los parches fijados a un andamio de nanoindicador sirven para fijar monómeros etiqueta a un andamio de nanoindicador. Los parches pueden estar directamente etiquetados, por ejemplo, mediante la incorporación covalente de uno o más monómeros etiqueta en parches de ácido nucleico. Como alternativa, los parches pueden estar fijados a aletas, que pueden estar etiquetados directamente, por ejemplo mediante la incorporación covalente de uno o más monómeros etiqueta en una aleta de ácido nucleico, o indirectamente, por ejemplo mediante hibridación de una aleta de ácido nucleico a un oligonucleótido que está fijado de manera covalente a uno o más monómeros de etiqueta. Si los monómeros de etiqueta fijados a una región de fijación de etiqueta no están directamente incorporados en un parche o aleta, el parche o aleta sirve como un “puente” entre el monómero de etiqueta y la región de fijación de etiqueta, y puede llevar la denominación de “molécula puente”, por ejemplo, un ácido nucleico puente.

Adicionalmente, los nanoindicadores pueden tener rótulos de afinidad para su purificación y/o para su inmovilización (por ejemplo, a una superficie sólida). Los nanoindicadores, o los complejos de nanoindicador-molécula diana, se purifican preferentemente en dos o más etapas de selección de afinidad. Por ejemplo, en un nanoindicador dual, una sonda puede comprender un primer rótulo de afinidad y la otra sonda puede comprender un segundo rótulo de afinidad (diferente). Las sondas se mezclan con moléculas diana, y los complejos que comprenden las dos sondas del nanoindicador dual se separan de los materiales no ligados (por ejemplo, la diana o las sondas individuales del nanoindicador) mediante purificación por afinidad contra uno o ambos de los rótulos de afinidad individuales. En la primera etapa, la mezcla puede ligarse a un reactivo de afinidad para el primer rótulo de afinidad, de manera que solamente las sondas que comprendan el primer rótulo de afinidad y los complejos deseados sean purificados. Los

materiales ligados se liberan del primer reactivo de afinidad y opcionalmente se ligan a un reactivo de afinidad para el segundo rótulo de afinidad, lo que permite la separación de los complejos desde las sondas que comprenden el primer rótulo de afinidad. A esta altura de los acontecimientos, solamente los complejos completos estarían ligados. Los complejos son finalmente liberados desde el reactivo de afinidad para el segundo rótulo de afinidad, después lo cual es preferente que sean estirados y procesados para obtener imágenes. El reactivo de afinidad puede ser cualquier superficie sólida recubierta de un compañero de ligación para el rótulo de afinidad, tal como una columna, una perla (por ejemplo, perla de látex o perla magnética) o estar recubierto en modalidad slide con el compañero de ligación. La inmovilización y el estiramiento de nanoindicadores mediante reactivos de afinidad se describen detalladamente en la Solicitud de Patente Provisoria U.S. N.º 60/753.816 de Sean M. Ferree and Dwayne L. Dunaway, titulada "Composiciones Que comprende Oriented, Immobilized Macromolecules and Methods for Their Preparation (Composiciones que comprenden macromoléculas orientadas inmovilizadas y métodos para su preparación)", expediente N.º 11616-014-888 presentada el 23 de diciembre de 2005.

El nanoindicador y los complejos de nanoindicador-diana que son o comprenden ácidos nucleicos pueden ser purificados por afinidad o inmovilizados mediante un ácido nucleico, tal como un oligonucleótido, que sea complementario con respecto a por lo menos una parte del nanoindicador o la diana. En una aplicación específica en la que la diana incluye un tramo poli A o poli dA, el complejo de nanoindicador-diana puede ser purificado o inmovilizado mediante un reactivo de afinidad recubierto con un oligonucleótido poli dT.

[0051]La secuencia de señales emitida por los monómeros de etiqueta asociados con las diversas regiones de fijación de etiqueta del andamio de un nanoindicador dado permite la identificación, única en su género, del nanoindicador. Un nanoindicador que tenga una identidad única o una signatura espectral única está asociado con una secuencia específica de la diana que reconoce una molécula diana específica o una de sus porciones. Cuando se expone un nanoindicador a una mezcla que contiene la molécula diana bajo condiciones que permiten la ligación de la secuencia específica de la diana(s) del nanoindicador a la molécula diana, la secuencia específica de la diana(s) se liga(n) preferentemente a la molécula diana. La detección del código espectral asociado al nanoindicador permite detectar la presencia de la molécula diana en la mezcla (análisis cualitativo). El conteo de la totalidad de los monómeros de etiqueta asociados al código espectral o signatura dados permite el recuento de todas las moléculas presentes en la mezcla asociadas con la secuencia específica de la diana acoplada al nanoindicador (análisis cuantitativo). Los nanoindicadores son por lo tanto útiles para el diagnóstico o pronóstico de diferentes estados biológicos (*por ejemplo*, enfermedad vs salud) mediante el análisis cuantitativo de marcadores biológicos conocidos. Además, la exquisita sensibilidad de la detección de una molécula individual y de su cuantificación provistas por los nanoindicadores descritos en la presente permite identificar nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico, inclusive aquellos cuyas fluctuaciones entre los diferentes estados biológicos es demasiado liviano para detectar una correlación con un estado biológico particular mediante los métodos moleculares convencionales. La sensibilidad de la detección de molecular basada en nanoindicadores permite un detallado análisis farmacocinético de los agentes terapéuticos y de diagnóstico en pequeñas muestras biológicas.

Muchos nanoindicadores, que llevan la denominación de "nanoindicadores singulares", están compuestos de una entidad molecular, como se ilustra en la Figura D. Sin embargo, para incrementar la especificidad de nanoindicadores y/o para la cinética de ligación a una molécula diana, un nanoindicador preferido es un nanoindicador dual compuesto de dos entidades moleculares, cada una de las cuales contiene una secuencia específica de la diana que se liga a una región de la misma molécula diana.

En las Figuras 1 A-1 C se ilustran varias realizaciones de nanoindicadores duales. En un nanoindicador dual, por lo menos una de las dos entidades moleculares está etiquetada. La otra entidad molecular no está necesariamente etiquetada. En la presente, tales componentes no etiquetados de los nanoindicadores duales llevan la designación de "sondas fantasma" (ver la Figura 1C) y frecuentemente tienen rótulos de afinidad fijados, que son útiles para inmovilizar y/o estirar el complejo que contiene el nanoindicador dual y la molécula diana para permitir la visualización del complejo y/o la formación de imágenes del mismo.

[0053]Debido a sus estructuras modulares, los nanoindicadores pueden ensamblarse y etiquetarse de diferentes maneras. Por ejemplo, es posible fijar un andamio de nanoindicador a una secuencia específica de la diana (por ejemplo, por hibridación y, opcionalmente, ligación), y la estructura que el andamio y la secuencia específica de la diana fijados a uno o más parches y, si se desea, aletas. Como alternativa, el andamio del nanoindicador puede primero fijarse a uno o más parches (y, opcionalmente, aletas), y la estructura de andamio/parche puede seguidamente fijarse a una secuencia específica de la diana. Por lo tanto, y a menos que se indique otra cosa, una exposición o listado de etapas en el ensamble de un nanoindicador no implica que deba seguirse una vía específica para el ensamble.

El ensamblado y utilización de nanoindicadores se ejemplifica en la presente a modo de descripción de una variedad de nanoindicadores basados en ácido nucleico; sin embargo, una persona experta en la especialidad reconocerá que los métodos descritos en la presente pueden aplicarse a un nanoindicador basado en aminoácido (o basado en ácido nucleico híbrido/ aminoácido). Ejemplos de nanoindicadores parcial y completamente ensamblados se enumeran más abajo .

En su forma más sencilla, un nanoindicador comprende un andamio que tiene por lo menos dos regiones de fijación de

etiquetas capaces de ser etiquetados y resueltos. El andamio puede ser cualquier entidad molecular que permita la formación de regiones de fijación de etiqueta en el andamio que pueden ser etiquetadas y resueltas por separado. El número de regiones de fijación de etiqueta que deben formarse en un andamio se basa en la longitud y naturaleza del andamio, los medios para etiquetar el nanoindicador, como también el tipo de monómeros de etiqueta que emitan una señal para ser fijados a las regiones de fijación de etiquetas del andamio. Tal como se describe en la presente, un nanoindicador puede tener un andamio que incluye dos o más regiones de fijación de etiqueta. Las estructuras de andamio adecuados incluyen andamios basados en ADN.

La descripción también provee nanoindicadores etiquetados en los que una o más regiones de fijación de etiqueta están fijadas a correspondientes monómeros de etiqueta, en donde cada monómero de etiqueta emite una señal. Por ejemplo, se obtiene un nanoindicador etiquetado cuando por lo menos dos monómeros de etiqueta están fijados a dos correspondientes regiones de fijación de etiqueta del andamio de manera tal que dichas regiones etiquetadas de fijación de etiqueta, o “manchas”, sean diferenciables.

Los monómeros de etiqueta que emiten una señal asociada con diferentes regiones de fijación de etiqueta del andamio pueden emitir señales que son espectralmente indistinguibles bajo las condiciones de detección (señales “similares”), o pueden emitir señales que son espectralmente distinguibles en las condiciones de detección.

En la presente se describe también un nanoindicador en el que dos o más monómeros de etiqueta están fijados a una región de fijación de etiqueta. La señal emitida por los monómeros de etiqueta asociados con la región de fijación de etiqueta produce una señal agregada que se detecta. La señal agregada producida puede estar compuestos de señales similares o compuestos por al menos dos señales espectralmente distinguibles.

En una variante, se describe un nanoindicador en el que por lo menos dos monómeros de etiqueta que emiten señales similares están fijados a correspondientes regiones de fijación de etiqueta del andamio y los dos monómeros de etiqueta son espacialmente distinguibles. En otra variante se describe un nanoindicador en el que por lo menos dos monómeros de etiqueta que emiten dos señales distinguibles están fijados a dos regiones vecinas de fijación de etiqueta, por ejemplo dos regiones de fijación de etiqueta adyacentes de manera tal que por lo menos dos monómeros de etiqueta son espectralmente distinguibles.

También se describe un nanoindicador en el que dos manchas que emiten señales similares están separadas por una región de separador. Una región de separador de este tipo permite una resolución, o una mejor resolución, de las señales similares emitidas por monómeros de etiqueta fijados en las dos manchas. En una variante, las regiones de separadores tienen una longitud determinada por la resolución de un instrumento utilizado para detectar el nanoindicador.

También se describe un nanoindicador con una o más “manchas dobles”. Cada mancha doble contiene dos o más (por ejemplo, tres, cuatro o cinco) manchas adyacentes que emiten señales similares sin ser separadas por una región de separador. Las manchas dobles pueden identificarse por sus magnitudes. Un monómero de etiqueta que emite una señal de acuerdo con la invención puede estar fijado de manera covalente o no covalente (*por ejemplo*, por medio de hibridación) a un parche que está fijado a la región de fijación de etiqueta. Los monómeros de etiqueta también pueden estar fijados de manera covalente o no covalente (*por ejemplo*, mediante hibridación) a una aleta fijada a un parche que a su vez está fijado al andamio. La aleta puede estar formada por una molécula o por dos o más moléculas (“piezas de aleta”) que forman una aleta dividida.

También se describe un nanoindicador asociado con un código espectral determinado por la secuencia de señales emitida por los monómeros de etiqueta fijados (*por ejemplo*, indirectamente por intermedia de un parche) a regiones de fijación de etiqueta en el andamio del nanoindicador, con lo que la detección del código espectral permite la identificación del nanoindicador.

En una variante, se describe un nanoindicador que además comprende un rótulo de afinidad fijado al andamio del nanoindicador, de manera tal que la fijación del rótulo de afinidad a un soporte permite el estiramiento del andamio y la resolución de señales emitidas por monómeros de etiqueta correspondientes a diferentes regiones de fijación de etiqueta en el andamio. El estiramiento de los nanoindicadores puede implicar cualquier medio de estiramiento conocido en la técnica e incluye sin limitación, medios físicos, hidrodinámicos o eléctricos.

Y en otra variante más, se describe un nanoindicador que además comprende aletas fijadas a regiones de fijación de etiqueta del andamio, en donde una aleta fijada a una región de fijación de etiqueta del andamio fija el monómero de etiqueta correspondiente a la región de fijación de etiquetas, con lo que de manera indirecta se fijan monómeros de etiqueta a correspondientes regiones de fijación de etiqueta en el andamio. En otra variante más, cada monómero de etiqueta comprende una porción que emite señales y una porción oligonucleotídica de una secuencia predeterminada, y las aletas comprenden repeticiones de secuencia de aleta complementarias con respecto a la porción oligonucleotídica de una etiqueta correspondiente, con lo que uno o más monómeros de etiqueta se fijan a una correspondiente región de fijación de etiqueta por medio de la hibridación de las porciones oligonucleotídicas de los monómeros de etiqueta a las repeticiones de la secuencia de aleta con lo que se produce un nanoindicador etiquetado.

Un nanoindicador puede además incluir una secuencia específica de la diana acoplada al andamio. La secuencia específica de la diana se selecciona para permitir que el nanoindicador reconozca, se ligue a, o se fije a una molécula

diana. Los nanoindicadores son adecuados para identificar moléculas diana de todos los tipos. Por ejemplo, es posible acoplar secuencias específicas apropiadas para la diana al andamio del nanoindicador del nanoindicador para permitir la detección de una molécula diana. Es preferente que la molécula diana sea ADN (lo que incluye cADN), ARN (lo que incluye mARN cARN), un péptido, un polipéptido, o una proteína.

5 Una variante de un método descrito provee una mayor flexibilidad en la detección de moléculas diana con monómeros de etiqueta de acuerdo con la invención. En esta realización, un nanoindicador dual que comprende dos entidades moleculares diferentes, cada una de ellas con una región específica de la diana separada, de las cuales por lo menos una está etiquetada, se ligan a la misma molécula diana. Por lo tanto, las secuencias específicas de la diana de los dos componentes del nanoindicador dual se ligan a diferentes porciones de una molécula diana seleccionada, con lo que la  
10 detección del código espectral asociado con el nanoindicador dual provee la detección de la molécula diana seleccionada en una muestra biomolecular puesta en contacto con el nanoindicador dual.

En el presente se describe también un método para detectar la presencia de una molécula diana en una muestra biomolecular que comprende: (i) colocar en contacto la muestra con un nanoindicador dual bajo condiciones que permiten la ligación de las secuencias específicas de la diana en el nanoindicador dual a la molécula diana; e (ii)  
15 detectar el código espectral asociado con el nanoindicador dual. En función de la arquitectura del nanoindicador, el nanoindicador dual puede ser etiquetado antes o después de su ligación a la molécula diana.

La estabilidad estructural de un nanoindicador puede incrementarse mediante la ligación de los parches, y opcionalmente, mediante la ligación de las aletas divididas y/o de los oligonucleótidos etiquetados hibridados a las aletas divididas.

20 Además de las capacidades de análisis cualitativa provistas por los nanoindicadores y de las técnicas analíticas basadas en ellos, los nanoindicadores de la invención son adecuados de manera única para llevar a cabo análisis cuantitativos. Por el hecho de proveer una ligación entre los nanoindicadores (tanto si se trata de nanoindicadores singulares o duales) de la invención y sus moléculas diana en una muestra biomolecular, la totalidad, o una porción representativa de, las moléculas diana presentes en una muestra puede identificarse y contarse. Este conteo individual  
25 de las diversas especies moleculares provee un método exacto y directo para determinar la concentración absoluta o relativa la molécula en la muestra biomolecular. Además, la capacidad de abordar cada molécula en una mezcla individualmente equilibra los beneficios de la miniaturización que incluyen una elevada sensibilidad, requerimientos mínimos en cuanto a la cantidad de muestras, y elevados coeficientes de rapidez de las reacciones provistos mediante la cinética en fase de solución en un volumen pequeño, en última instancia bajos costos en reactivos.

30 Como se comprenderá de la descripción y ejemplos provistos más abajo, los métodos y entidades descritos presentan numerosas ventajas. Por ejemplo, la modularidad compleja en la formación de los nanoindicadores de acuerdo con la invención permite la creación sistemática de bibliotecas de nanoindicadores únicos en su clase que tienen un grado de diversidad muy elevado (*por ejemplo*, millones de nanoindicadores reconocibles de manera única en su género). Esta modularidad permite flexibilizar las poblaciones de nanoindicador para aplicaciones específicas que a su vez proveen  
35 significativas eficiencias de fabricación. Otra ventaja que se apreciará en base a la siguiente descripción procede de la flexibilidad en el ensamble de los nanoindicadores. Es decir, debido a su estructura molecular, los nanoindicadores pueden ensamblarse antes de su despacho a un punto de uso o ser ensamblados en el punto de uso.

### 5.1 Nomenclatura de nanoindicadores

40 Todos los términos utilizados en la presente tienen sus significados habituales para las personas expertas, a menos que se indique otra cosa. Los términos siguientes tendrán los significados siguientes.

PAR DE LIGACIÓN. La expresión "par de ligación" se refiere a moléculas primeras y segundas de porciones que son capaces de ligarse selectivamente entre sí, es decir, de ligarse entre sí con una mayor afinidad que con respecto a otros componentes en una composición. La ligación entre los miembros del par de ligación puede ser de tipo covalente o de tipo no covalente. En determinadas realizaciones, la ligación es de tipo no covalente. Los ejemplos de pares de  
45 ligación incluyen pares de ligación inmunológicos (por ejemplo, cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo correspondiente o porción o fragmento ligante del mismo, por ejemplo digoxigenina y anti-digoxigenina, fluoresceína y anti-fluoresceína, dinitrofenol y antidinitrofenol, bromodesoxiuridina y anti-bromodesoxiuridina, inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina antirratón de cabra) y pares de ligación no inmunológicos (por ejemplo, biotina-avidina, biotina-estreptavidina, hormona-proteína de ligación de hormona, recd1-ligando de receptor (por ejemplo, receptor de acetilcolina-acetilcolina o una de sus análogos), IgG-proteína A, lectina-carbohidrato, enzima-cofactor de enzima, enzima-inhibidor de enzima, pares de polinucleótidos capaces de formar dúplex de ácidos nucleicos, y similares). Por ejemplo, los miembros de ligación inmunorreactivos pueden incluir antígenos, haptenos, aptámeros, anticuerpos (primarios o secundarios), y sus complejos, lo que incluye aquellos  
50 formados mediante métodos de ADN recombinante o síntesis de péptidos. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, una proteína recombinante o una o más mezclas o fragmentos de ella, como también una mezcla y otros miembros de ligación. Otros pares comunes de ligación incluyen sin limitación, biotina y avidina (o sus derivados), biotina y estreptavidina, carbohidratos y lectinas, secuencias nucleotídicas complementarias (lo que incluye secuencias de ácidos nucleicos de sonda y de captura), secuencias peptídicas complementarias que incluyen aquellas formadas mediante métodos recombinantes, moléculas efectoras y receptoras, hormonas y proteína

de ligación a hormona, cofactores de enzima y enzimas, inhibidores de enzimas, etc.

MANCHA OSCURA. La expresión “mancha oscura” se refiere a una falta de señal, o “mancha”, desde un sitio de fijación de etiqueta en un nanoindicador. Las manchas oscuras pueden estar incorporadas en el código del nanoindicador para añadir más permutaciones de codificación y generar una mayor diversidad de nanoindicadores en una población de nanoindicadores.

ESTADO EXTENDIDO. La expresión “Estado extendido” se refiere a un nanoindicador en un estado que sería reconocido por una persona experta en la especialidad. En determinadas realizaciones, un nanoindicador se halla en un estado extendido cuando está extendido con respecto a la su conformación nativa en solución. En determinadas realizaciones, un nanoindicador se halla en un estado extendido cuando se halla en el campo de una fuerza capaz de extender el nanoindicador. En determinadas realizaciones, un estado extendido de un nanoindicador puede determinarse de manera cuantitativa. En tales realizaciones, las personas expertas en la especialidad reconocerán a R como el vector extremo a extremo del nanoindicador, es decir, la distancia entre dos términos del nanoindicador, y  $\langle R \rangle$  como el vector de extremo a extremo de manera tal que el 95% de R estará dentro de  $2\langle R \rangle$  en una solución que será considerada adecuada a una persona experta en la especialidad. Los ejemplos de solución incluyen, por ejemplo, una solución diluida del nanoindicador en agua o en un tampón de pH. En realizaciones particulares, un nanoindicador se halla en un estado extendido cuando R es mayor que  $2.0\langle R \rangle$ .

ALETA. El término “aleta” utilizado en la presente se refiere a una entidad molecular fijada a un parche o par de parches fijados a una región de fijación de etiqueta. La aleta consiste en una o más moléculas que contienen monómeros de etiqueta o que son capaces de ligar una o más moléculas que contiene monómeros de etiqueta. Por el hecho de proveer un etiquetado indirecta de las regiones, las aletas proveen una mayor flexibilidad en el control del número de monómeros emisores de señales asociados con una región como también la naturaleza de dicho comonomeros. Las aletas pueden formarse mediante una única pieza molecular o mediante varias piezas moleculares (por ejemplo, dos piezas) que forman una “aleta dividida” (ver, por ejemplo, la Figura 7).

SONDA FANTASMA. Se trata de una molécula que comprende una secuencia específica de la diana, pero que no está etiquetada con un monómero de etiqueta que emite una señal que contribuye al código del nanoindicador.

NANOINDICADOR ETIQUETADO. Un nanoindicador etiquetado es un nanoindicador en el que por lo menos un parche del nanoindicador está fijada a uno o más monómeros de etiqueta que genera(n) una señal que forma por lo menos parte del código del nanoindicador.

JUNIDAD DE ETIQUETA. La expresión “unidad de etiqueta” se refiere a las porciones no específicas de la diana, de un nanoindicador etiquetado.

NANOINDICADOR. La expresión “nanoindicador” se refiere a una entidad molecular que tiene: (i) una molécula (“andamio”) que contiene por lo menos dos regiones de fijación de etiqueta; (ii) por lo menos un parche fijado a por lo menos una región de fijación de etiqueta; y (iii) una secuencia específica de la diana. Como se describe con detalle más abajo, los nanoindicadores pueden ser nanoindicadores singulares (estando todos los componentes en una única entidad molecular) o nanoindicadores duales (estando todos los componentes en dos entidades moleculares separados). Los nanoindicadores son preferentemente sintéticos, es decir se trata de moléculas que no son de presentación natural; por ejemplo Son moléculas quimérica sin ellas uniendo dos o más secuencias artificiales y1 de presentación natural que normalmente existen en más de una molécula (por ejemplo, plásmido, cromosoma, genoma viral, proteína, etc.).

CÓDIGO DE NANOINDICADOR. El orden y la naturaleza (por ejemplo, La obra las longitudes de onda primarias, opcionalmente también la longitud) de las manchas de un nanoindicador sirven como un código de nanoindicador que identifica la molécula diana que tiene la capacidad ser ligada por el nanoindicador por intermedio de la secuencia específica del nanoindicador para la o las diana(s). Cuando el nanoindicador está ligado a una molécula diana, el código de nanoindicador también identifica la molécula diana. Opcionalmente, la longitud de una mancha puede ser un componente del código de nanoindicador.

ESTADO ORIENTADO. La expresión “estado orientado” se refiere a un nanoindicador en un estado que sería reconocido como orientado por una persona experta en la especialidad. En determinadas realizaciones, un nanoindicador se halla en un estado orientado cuando está orientado con respecto a su conformación nativa en solución. En determinadas realizaciones, el nanoindicador está orientado cuando está dispuesto en paralelo con el campo de una fuerza capaz de orientar el nanoindicador. En determinadas realizaciones, el nanoindicador Está orientado cuando se trata de uno de entre una pluralidad de nanoindicadores que están dispuestos en paralelo, como reconocen las personas expertas.

PARCHE. El término “parche” se refiere a una entidad molecular fijada a la región de fijación de etiqueta del andamio del nanoindicador, en términos generales para los fines de etiquetar el nanoindicador. El parche puede tener uno o más monómeros de etiqueta fijados sea directamente (de manera covalente o no covalente) o indirectamente fijados a él, sea antes sea después de su fijación al andamio del nanoindicador.

SONDA. Es término se refiere a una molécula que tiene una secuencia específica de la diana. En el contexto de una

nanoindicador singular, la expresión “sonda” se refiere al nanoindicador como tal; en el contexto de un nanoindicador dual, la expresión “sonda” se refiere a uno de los dos componentes del nanoindicador o ambos componentes del nanoindicador.

PAR DE SONDAS. La expresión “par de sondas” se refiere a un nanoindicador dual.

5 REGISTRO. El término “registro” se refiere a un conjunto de regiones de fijación de etiqueta alternativas.

LIGACIÓN SELECTIVA. La expresión “ligación selectiva” se refiere a cualquier ligación preferencial de un par de moléculas o porciones entre sí con respecto a otras moléculas o porciones en una composición que sería reconocida por una persona experta en la especialidad. En determinadas realizaciones, un par de moléculas o porciones se liga selectivamente cuando se ligan preferentemente entre sí en comparación con otras moléculas o porciones. La ligación selectiva puede incluir la afinidad o avidéz, o ambas, de una molécula o porción con respecto a otra molécula o porción. En realizaciones particulares, la ligación selectiva requiere una constante de disociación ( $K_D$ ) inferior a aproximadamente  $1 \times 10^{-5}$  M o inferior a aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M, o  $1 \times 10^{-10}$  M. En cambio, en determinadas realizaciones, la ligación no selectiva tiene una afinidad significativamente inferior, por ejemplo, una  $K_D$  superior a  $1 \times 10^{-3}$  M.

15 MANCHA. Una mancha, en el contexto de la detección de un nanoindicador, es una señal agregada detectada procedente de los monómeros de etiqueta fijados a un único sitio de fijación de etiqueta en un nanoindicador, y que, en función del tamaño de la región de fijación de etiqueta y de la naturaleza (*por ejemplo*, longitud de onda de emisión primaria) de los monómeros de etiqueta, puede aparecer como una fuente de luz de un solo punto cuando se visualiza bajo un microscopio. Las manchas de un nanoindicador pueden ser de tipo superpuesto o no superpuesto. El código de nanoindicador que identifica dicha molécula diana puede comprender cualquier permutación de la longitud de una mancha, su posición con respecto a otras manchas, y/o la naturaleza (*por ejemplo*, la o las longitudes de onda de emisión primaria(s)) de su señal.

25 SECUENCIA ESPECÍFICA DE LA DIANA. La expresión “secuencia específica de la diana” se refiere a una entidad molecular que es capaz de ligarse a una molécula diana. En el contexto de un nanoindicador, la secuencia específica de la diana está fijada al andamio de nanoindicador. Es preferente (pero no necesario) que la molécula diana sea una molécula de presentación natural o un cADN de una molécula de presentación lateral o el complemento del cADN.

## 5.2 Andamio del nanoindicador

El andamio de un nanoindicador puede ser cualquier entidad molecular, más preferentemente una molécula de ácido nucleico, que contiene regiones de fijación de etiqueta a las que los monómeros de etiqueta pueden estar fijados de manera directa o indirecta. En una realización, un andamio de nanoindicador es un andamio de proteína; en una realización preferida, el andamio de un nanoindicador es un andamio de ácido nucleico en el que las regiones de fijación de etiqueta son regiones monocatenarias a las que pueden fijarse por hibridación otros ácidos nucleicos, tales como parches de oligonucleótidos, parches de ARN, o parches de ADN.

En realizaciones específicas, el andamio de un nanoindicador es una molécula de ácido nucleico.

35 No existen limitaciones particulares en cuanto a los tipos de andamios que son adecuados para formar un nanoindicador. Un andamio de acuerdo con la invención puede esencialmente tener cualquier estructura, lo que incluye, *por ejemplo*, un andamio lineal monocatenario, un andamio lineal bicatenario, un andamio circular monocatenario o un andamio circular bicatenario. Los ejemplos de estructuras del andamio incluyen, *por ejemplo*, un andamio hecho de una entidad molecular tal como polipéptidos; ácidos nucleicos o carbohidratos. Un andamio puede también incluir una combinación de estructuras, *por ejemplo*, un andamio puede ser hecho de uno o más tramos de polipéptidos acoplados a uno o más tramos de carbohidrato.

45 Las entidades moleculares adecuados para utilizarse como andamios incluyen las estructuras poliméricas, particularmente estructuras poliméricas basadas en ácidos nucleicos tales como ADN. Las estructuras basadas en ácidos nucleicos ofrecen numerosas ventajas en el contexto de la presente invención debido por lo menos en parte al amplio universo de técnicas y metodologías existentes que permiten la manipulación de constructos de ADN.

Como se indicó en lo que precede, el andamio puede ser monocatenario o bicatenario. Un andamio bicatenario puede ser sea un ADN bicatenario convencional sea un ADN bicatenario que está compuesto de un tramo monocatenario lineal de ácido nucleico con unidades parche o unidades de aleta fijadas. En la Figura 8 se ilustra un esquema para formar un andamio linealizado.

50 Un andamio puede tener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-100 regiones de fijación de etiqueta o más.

Las regiones de fijación de etiqueta de un andamio de nanoindicador variarán en magnitud en función del método de etiquetado. En diversas realizaciones, una región de fijación de etiqueta tiene una longitud en cualquier parte entre 10 nm y 10.000 nm, pero es más preferente que sea 50 nm a 5.000 nm, más preferentemente de 100 nm a 1.000 nm. En diversas realizaciones, la región de fijación de etiqueta es de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 500 nm,

de aproximadamente 150 nm a aproximadamente 450 nm, de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 400 nm, o de 250 a aproximadamente 350 nm. En una realización preferida, la región de fijación de etiqueta corresponde estrechamente a la magnitud de una mancha limitada por difracción, *por ejemplo*, la mancha más pequeña que pueda detectarse mediante ópticas estándar, que es de aproximadamente 300 nm.

5 Si el andamio es un ácido nucleico, una magnitud de 1 nm corresponde aproximadamente 3 nucleótidos; por lo tanto, una región de fijación de etiqueta de aproximadamente 300 nm corresponde a aproximadamente 900 bases. En otras realizaciones preferidas, la región de fijación de etiqueta es de aproximadamente 300 nucleótidos a aproximadamente 1,5 kb, de aproximadamente 450 nucleótidos a aproximadamente 1,35 kb, de aproximadamente 0,6 kb a aproximadamente 1,2 kb, o de 0,75 kb a aproximadamente 1,05 kb.

10 Un ejemplo ilustrativo de una entidad molecular para un andamio de nanoindicador es M13 ADN, que es monocatenario. En una realización, el andamio de nanoindicador es ADN circular por lo menos parcialmente monocatenario, tal como M13 circular.

En una realización más preferida, un andamio de nanoindicador es ADN lineal por lo menos parcialmente monocatenario, tal como M13 lineal. En una realización específica, el ADN monocatenario M13 obtenido operando un  
15 corte en el sitio BamHI site de M13n ADN circular.

Cabe observar que dentro del contexto de la presente invención, un ADN lineal provee ventajas adicionales en comparación con ADN circular. Una de las ventajas de formar un andamio se refiere al estrés torsional significativamente reducido asociado con un ADN lineal. El estrés torsional añadido asociado con un ADN circular puede interferir con la integridad estructural del andamio al tener lugar la adición, al andamio del nanoindicador, de otros componentes del nanoindicador, tales como unidades de parche. Un estrés torsional severo puede ocasionar la desintegración de la estructura del andamio. Sin embargo, cabe observar que los nanoindicadores en los que solamente unos pocos sitios, cortos, de fijación de etiqueta están etiquetados, un ADN circular puede ser adecuado.  
20

#### 5.2.1 Novedosas secuencias sintéticas de andamios de nanoindicador

Los nanoindicadores descritos en la presente son moléculas de ácido nucleico artificiales (ADN, AN, o híbridos de ADN/ARN) diseñados de manera de tener rasgos que optimizan el etiquetado y la detección del nanoindicador. En estos aspectos un andamio de nanoindicador es un ácido nucleico artificial que comprende una o más secuencias sintéticas con una longitud de 50 a 50.000 bases. Por lo tanto, un andamio de nanoindicador, que preferentemente es un ADN, está diseñado de manera de tener una o más regiones, útiles como regiones de fijación de etiqueta, que comprenden un patrón regular de una base en particular (la "base regularmente repetida"). En tales regiones, la base regularmente repetida se presenta con una periodicidad de cada n-ésimo residuo, en donde n es cualquier número, y preferentemente de 4 a 25.  
25  
30

Es preferente que no más del 25% de la base de repetición regular en una Región aparezca en intervalos que no son los intervalos regulares. Por ejemplo, si en una Región de 100 nucleótidos hay 12 bases de timidina, y la timidina es la base de repetición regular, en este aspecto de la invención no más del 25% de estos, es decir, 3 bases de timidina, aparecen fuera del patrón regular de las timidinas. En realizaciones específicas, no más del 20%, no más del 15%, no más del 10%, no más del 9%, no más del 8%, no más del 7%, no más del 6%, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2% o no más del 1% de la base, aparece en intervalos de la región que no son los intervalos regulares en la región.  
35

La base de repetición regular en las Regiones en un andamio de nanoindicador, o su base de repetición complementaria regular en un parche (o segmento) fusionado puede utilizarse para fijar monómeros de etiqueta, preferentemente monómeros de etiqueta emisores de luz, al nanoindicador en un patrón regular, uniformemente separado, para una mejor distribución de la señal del nanoindicador. Es preferente que, cuando se etiquete una Región, por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 80%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95% o por lo menos el 98% de las presentaciones de la base de repetición regular esté fijado a por lo menos un monómero de etiqueta emisor de luz, sea por fijación covalente de un monómero de etiqueta a una base, o por hibridación a un ácido nucleico en el que los complementos de la base de repetición regular están así etiquetados.  
40  
45

Este porcentaje de presentaciones puede medirse mediante cualquier medio conocido en la especialidad. En un método, la cantidad de ácido nucleico producido en una reacción de etiquetado se purifica (por ejemplo, el ARN puede verificarse mediante un kit Qiagen RNeasy) y se somete a una espectrofotometría de UV. Se mide la absorción ("A") a las longitudes de onda adecuadas para cada uno de los ácidos nucleicos (260 nm) y para el monómero de etiqueta cuya ocurrencia debe medirse (*por ejemplo*, 495 nm para Alexa Fluor 488; 590 nm para Alexa Fluor 594; 650 para Alexa Fluor 647; y 550 nm para Cy3). Se corrige la absorción del ácido nucleico ajustando el valor de la absorción a 260 nm ("A260") para remover la contribución de "ruido" del monómero de etiqueta para lo cual se resta la absorción en la longitud de onda pico para el monómero de etiqueta (ALM) menos el factor de corrección correspondiente a dicho monómero de etiqueta. Si el ácido nucleico es ARN, el número de monómeros de etiqueta por cada mil nucleótidos puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula :  
50  
55

no. de monómeros de etiqueta =  $A_{260} \times 9010 \times 1000$

1.000 nucleótidos  $A_{LM} EC_{LM}$

donde  $EC_{LM}$  es el factor de extinción para el monómero de etiqueta. A partir de esta fórmula, es posible calcular el porcentaje de ocurrencias de la base de repetición regular que están fijadas a un monómero de etiqueta emisor de luz.

5 En términos generales, la base de repetición regular preferida en una región de fijación de etiqueta es la timidina, de manera tal que la región puede ser etiquetada mediante hibridación a uno o más parches complementarios (*por ejemplo*, segmentos de ARN) en los que la base de repetición regular es la uridina. Esto permite la utilización de UTPs amino-alilo modificados, fáciles de obtener en el comercio, como sitios de fijación de monómero de etiqueta, en una secuencia por demás aleatoria. Es preferente que, además de la periodicidad regular de las Regiones, las regiones (y el ácido nucleico que los comprende) contenga una estructura secundaria mínima. El contenido GC global se mantiene preferentemente cercano al 50%, y es preferente que se mantenga constante a lo largo de tramos relativamente cortos para que TMs sean similares.

15 Es preferente que los ácidos nucleicos artificiales descritos en la presente, o por lo menos las Regiones en ellos, no tengan repeticiones directas ni invertidas mayores de 12 bases de longitud. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos artificiales y/o las Regiones no tienen repeticiones directas o invertidas que tengan una longitud superior a la 11, 10 ó 9.

20 En un ejemplo de región en el que el nucleótido regularmente repetido es una timidina y el contenido de GC es de aproximadamente el 50%, las adeninas compensarían la pérdida de abundancia de los Ts. Para generar la secuencia seleccionada, se crean secuencias aleatorias con patrones fijos de Ts en el intervalo de cada cuarta base a cada 25ésima base, y se la somete a una selección para minimizar la presencia de repeticiones invertidas y directas.

25 También se someten a selección preferentemente las secuencias para evitar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de cuchilla de seis bases, comunes. Las secuencias seleccionadas son adicionalmente sometidas a un análisis de las estructuras secundarias predichas, y aquellas con la menor estructura secundaria se eligen para su evaluación ulterior. Para predecir la estructura secundaria puede utilizarse cualquier programa conocido en la especialidad, tal como el programa MFOLD (Zuker, 2003, Nucleic Acids Res. 31 (13):3406-15; Mathews *et al*, 1999, J. Mol. Biol. 288:911-940).

30 Se divide una secuencia adecuada en regiones de fijación de etiqueta en el intervalo de 50 bases a 2 kilobases (podrían ser más largas). Cada región de fijación de etiqueta es una secuencia única, pero contiene un número y separación de Ts, constantes en relación con las otras etiquetas en una secuencia indicadora dada. Estas regiones de fijación de etiqueta pueden estar interdispersas junto con otras regiones cuya secuencia no interesa. Las regiones de fijación de etiquetas sintéticas en un andamio de nanoindicador pueden ser de diferentes longitudes y/o tener diferentes bases de repetición regulares. Una secuencia inicial optimizada para la transcripción por la ARN polimerasa T7, T3, o SP6 (que empiece en la posición +1 del transcripto) puede añadirse al extremo 5' de cada región de fijación de etiqueta. Los sitios de restricción son adicionalmente añadidos a los límites de cada región de fijación de etiqueta para permitir la adición o delección específicas de regiones de fijación de etiqueta individuales a la secuencia mediante la utilización de técnicas de clonación individuales. Es preferente que el número de regiones de fijación de etiqueta sintéticas en un nanoindicador se halle en el intervalo de 1 a 50. Y en otras realizaciones, el número de regiones de fijación de etiqueta sintéticas en un nanoindicador se halla en el intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 regiones de fijación de etiqueta sintéticas o de 15, 20, 30, 40 ó 50 regiones de fijación de etiqueta sintéticas, o en cualquier intervalo intermedio.

45 Más abajo se da un ejemplo de una región sintética novedosa de fijación de etiqueta de este tipo. En esta secuencia, mostrada de 5' a 3', los Ts están colocados en cada octava posición y la región está delimitada por un sitio de restricción 5' Sac I y por un sitio de restricción 3' Kpn I. Se incluye un sitio de iniciación de transcripto optimizado para la T7 polimerasa (GGGAGA) en el extremo 5' de la región, corriente abajo del sitio de restricción 5'. El complemento de esta secuencia, cuando ha sido generada en forma de una molécula monocatenaria, forma el andamio para la molécula de ARN transcrita desde esta región de fijación de etiqueta.

**GAGCTCGGGAGATGGCGAGCTGGAAGCATCAGAAAGTAGGAAGATGACAA  
AATAGGGCCATAGAAGCATGAAGAACTGAACGCATGAGACAATAGGAAGC  
TACGCCACTAGGGACCTGAGAAGCTGAGCGGCTCAGCGGGTCCGAGCGTC  
AAAAAATAAAAGAGTGAAACAATAGACGAATGACGCGGTAAAACCATCCA  
GAAGTAAACGGGTACAAACATACAGAGATAGCCACCTGGACCAATAGGCA**

CGTACAAACGTACAAGCCTGGCGCGATGAGGCAATCCACACGTGCAGAGC  
 TGGAACAATGGAAAGATGCAAGAATAAACCGATACCGGGATCGAGGGCTC  
 AGCGAATAAAGCAGTCAACAACCTGGAAAGATCCACACATACCGGCGTAAC  
 CGAGTCCAAACATACAGACCTGCAAGACTCGCGACATGGGACGGTAAAAC  
 CATCCGACCGTAAACCGGTAAACCAGGTAGCCGGGTAAAAACATAGCAGGG  
 TGGAGACCTCAGAACGTAAAGACGTCCAAGGGTCGCCGGATAGCGAACTA  
 CGCGCATCGCCCAATGGGCCAATCAACAGATAAACGAGTAGAAAAGTCAG  
 AAAATAAGAACTAACGAAATACGAGGGTCCAAGGATGCAAGACTGAGGC  
 CCTAAGGAGATAAGGAAATAGGCCGATGCAGACCTGAAACGATGCACCGA  
 TCCGACGGTAAAAGACTAGACACGTAGCCGGATCAGGGCCTGGGAGGCTG  
 GAACCGTGAGCACATAGCAAAGTCGCAGCGTCGGCAGATGCGCCGGTAAA  
 AAAGTAGAGGCATGACCGGATGGGCCAAATAGCGACGTACAGCAGTGAAGC  
 ACTAAAAGCATCCAAGGGTAGGAGACTAGGCGCCTCGACGGGTAGGTACC  
 (SEQ ID NO: 1)

- Los ácidos nucleicos sintéticos pueden sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos de presentación natural o nucleótidos diversamente modificados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del duplex formado entre la región de fijación de etiqueta y los parches o segmentos fusionados, por ejemplo, pueden utilizarse derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos por acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar el ácido nucleico sintético incluyen 5-fluoruracilo, 5-bromouracilo, 5-cloruracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.
- Como alternativa, el ácido nucleico sintético puede producirse por vía biológica utilizando un vector en el que un ácido nucleico ha sido subclonado.

- En diversas realizaciones, las moléculas sintéticas de ácido nucleico pueden modificarse en la parte de base, parte de azúcar o médula de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación, o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la estructura básica de desoxirribosa fosfato de los ácidos nucleicos puede modificarse para generar ácidos nucleicos peptídicos (ver: Hyrup *et al.*, 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1):5-23). Como se utilizan en la presente, las expresiones "ácido nucleico peptídicos" o PNA (peptide nucleic acids) se refieren a miméticos de ácidos nucleicos, *por ejemplo*, miméticos de ADN, en los que la columna vertebral desoxirribosa fosfato ha sido reemplazada por una columna vertebral pseudopéptido y solamente se conservan las cuatro nucleobases naturales. La columna vertebral neutra de los PNAs ha sido mostrada para permitir la hibridación específica a ADN y ARN bajo condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de los oligómeros de PNA puede llevarse a cabo utilizando los protocolos para la síntesis de péptidos en fase sólida descritos en: Hyrup *et al.*, 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23; Perry-O'Keefe *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675.

- En un ejemplo de realización, la novedosa secuencia sintética seleccionada puede construirse sintéticamente en forma de ADN bicatenario por una empresa que se dedica a la síntesis comercial de genes, y clonarse de manera orientada en un "fagémido", que es un vector de plásmido que contiene una región M13 o intergénica de fago (IG) que contiene las secuencias *cis*-actuantes necesarias para la replicación del ADN y para la encapsidación de fago, tal como pUCI 19. La orientación adecuada del inserto clonado con respecto al origen de fago de replicación permite la generación de un andamio de ADN monocatenario que es el complemento inverso de las moléculas de ARN generadas mediante transcripción *in vitro* para cada región de fijación de etiqueta.

- A título de ejemplo, para generar el andamio de ADN monocatenario del novedoso reportero, el fagémido se transforma en una cepa de *E. coli* que contiene un episoma F'. La subsiguiente infección de la bacteria transformada con un fago helper tal como el mutante MI 3 K07 resulta en la secreción del fagémido portador de la novedosa secuencia indicadora como un fago monocatenario empacado a partir del cual se prepara el ADN circular

monocatenario para lo cual se utiliza un protocolo estándar. Este ADN se linealiza y la porción de vector se extirpa mediante la fusión de oligonucleótidos cortos complementarios en cualquiera de los extremos de la novedosa secuencia indicadora para generar sitios de restricción bicatenarios, seguido por el tratamiento con las enzimas de restricción adecuadas.

- 5 A título de ejemplo, para componer las moléculas de ADN (parches o “segmentos”) para cada región de fijación de etiqueta, se diseñan cebadores de PCR para generar una plantilla bicatenaria que empiece con un Promotor de polimerasa de ARN (T7, T3, o SP6) situado directamente corriente arriba (5’) del sitio de iniciación de la transcripción y que termine después del sitio de la enzima de restricción 3’. Mediante esta plantilla, se lleva a cabo la transcripción de moléculas de ARN en la presencia de una base de repetición amino-allil modificada regular en el ARN (*por ejemplo*, UTP) y de otras bases no modificadas (*por ejemplo*, ATP, CTP y GTP). Esto conduce a un producto ARN en el que cada base de repetición regular (*por ejemplo*, U) ha sido modificada para permitir el acoplamiento covalente de un monómero de etiqueta en dicha posición en la molécula de ARN.

El acoplamiento de monómeros de etiqueta emisores de luz a las moléculas de ARN y la fusión de las moléculas de ARN de etiquetadas al andamio del nanoindicador se llevan a cabo como se describe abajo.

- 15 En la siguiente Tabla 1 se enumeran algunas consideraciones de diseño para la secuencia de novo.

Tabla 1

Rasgo del andamio sintético	Ventajas
Novedosa secuencia sintética	Puede ser de cualquier longitud y estar diseñado para incorporar cualquier aspecto de secuencia deseada, lo que incluye sin limitación los enumerados en esta tabla.
Estructura secundaria mínima (seleccionada en contra de repeticiones invertidas)	Permite la transcripción coherente de moléculas de ARN de longitud completa. Permite la fusión constante de moléculas de ARN al andamio a temperaturas predecibles. Minimiza la autofusión y/o la fusión cruzada entre las moléculas de ADN o andamios.
Secuencias repetidas mínimas	Evita la fusión errónea entre las moléculas de ARN y regiones de andamio inadecuadas.
Sitios de restricción únicos en los bordes de las regiones de fijación de etiqueta	Permite la adición y delección de regiones de fijación de etiqueta individuales mediante la utilización de técnicas estándar para la clonación molecular.
Separación uniforme definida de Ts y transcripción con UTP modificado con amino-allilo (UTP no modificado)	Controla el número de sitios de acoplamiento para comonómeros en cada región de fijación de etiqueta, lo que permite brillo constante de moléculas de ARN etiquetadas. Controla la distancia entre los monómeros: es posible optimizar la separación para evitar impedimento esteárico y el apagado de la fluorescencia.
Secuencia de partida optimizada para la transcripción por la polimerasa de ARN T7, T3 o SP6	Promueve una transcripción <i>in vitro</i> eficiente de cada región de fijación de etiqueta.

### 5.3 PARCHES

- 20 Los monómeros de etiqueta que emiten señales que constituyen la totalidad o parte del código del nanoindicador están fijados a una o más regiones de fijación de etiqueta(s) del andamio del nanoindicador por intermedio de una estructura que en la presente lleva la denominación de “parche.” Los monómeros de etiqueta pueden estar fijados directamente (*por ejemplo*, de manera covalente o no covalente) a un parche, o estar fijados indirectamente fijados a un parche (*por ejemplo*, por medio de hibridación).

Los parches de ácidos nucleicos puede tener una longitud cualquiera de entre 25 nucleótidos y varias kilobases (*por*

*ejemplo*, 5kb), y es preferente que tengan una longitud de 50 nucleótidos. En realizaciones específicas, los parches de ácido nucleico tienen una longitud de aproximadamente 25-250, 50-200, 50-150, o 50-100 nucleótidos. En otras realizaciones, los parches de ácido nucleico tienen una longitud de aproximadamente 500-2.000, 500-1.500, 500-1.000, 750-1.250, o 750-1.000 nucleótidos. Los parches de ácido nucleico pueden ser parches de ARN o parches de ADN.

Un monómero de etiqueta puede ser fijado de manera covalente a un parche antes o después de que el parche sea fijado a la región de fijación de etiqueta de un andamio de nanoindicador. Por ejemplo, cuando el parche es una molécula de ácido nucleico, la etiqueta puede fijarse de manera covalente mediante la incorporación de un nucleótido que contiene un monómero de etiqueta en el ácido nucleico durante su síntesis pero antes de que se haya fijado, *por ejemplo*, vía hibridación, a la región de fijación de etiqueta del andamio. Como alternativa, durante la síntesis de un parche de ácido nucleico, puede incluirse un nucleótido que contiene un grupo aceptor de monómero de etiqueta, y el monómero de etiqueta se añade al parche de ácido nucleico después de su síntesis, sea antes o después de ser fijado a la región de fijación de etiqueta del andamio. Como alternativa, el monómero de etiqueta puede ser fijado indirectamente al parche, por ejemplo mediante hibridación del parche a una "aleta" que sirve como una base para la fijación del monómero de etiqueta al nanoindicador.

Por lo tanto, cuando un parche es un ácido nucleico, puede tener cualquier valor en el intervalo de 20 nucleótidos a más de 5 kb de longitud, en función del método utilizado para ensamblar el nanoindicador.

Por ejemplo, cuando un parche ha sido incorporado covalentemente en el uno o más monómeros de etiqueta que emiten señales que son partes del código de nanoindicador en el contexto del nanoindicador etiquetado, es preferente que tenga una longitud de aproximadamente 500-1.500 nucleótidos, y en términos generales en la presente lleva la denominación de "segmento", siendo un "segmento oscuro" el parche antes de la incorporación del monómero de etiqueta (pero, en una realización preferida, que contiene sitios aceptores de monómeros de etiqueta, tales como monómeros amino alilo), y un "segmento de color" es un segmento que contiene el o los monómeros de etiqueta deseados.

Cuando un parche sirva meramente como una plantilla para la fijación de la aleta al nanoindicador, en tal caso es preferente que su tamaño sea menor, por ejemplo de aproximadamente 25-250 nucleótidos de longitud, siendo más preferente que su longitud sea de aproximadamente 50-100 nucleótidos. En la presente, tales parches llevan la denominación de "parches de oligonucleótidos". Como se explica en el siguiente capítulo, este permite que un oligonucleótido tenga una secuencia complementaria con respecto a la de un andamio, de manera tal cuando se lo fusiona al andamio, se genera una saliente o voladizo que es complementaria con la totalidad o porción de una aleta.

Las expresiones "segmento" y "parche de oligonucleótido" se utilizan en la presente meramente por comodidad de distinción; sin embargo, no hay un corte de tamaño para diferenciar un "segmento" de un "parche de oligonucleótido". El objeto de ambos tipos de estructuras es el de maximizar el etiquetado y por lo tanto la intensidad de señal procedente del nanoindicador, con lo que se permite una detección de una molécula diana individual por un nanoindicador.

En determinados aspectos, en la presente se describe una molécula sintética, cuya configuración se ilustra haciendo referencia a la Figura 7A, que comprende una cadena de un ácido nucleico (andamio) y una pluralidad de pares de parches hibridados a la cadena, en donde cada par de parches comprende un parche "A" y un parche "B", y, para cada par de parches, (a) cada parche "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región (1P) y una segunda región (2P), estando la primera región (i) en el extremo alfa del parche "A", e (ii) hibridado a una primera porción de la cadena, estando la segunda región situada (ii) en el extremo beta del parche "A"; (b) cada parche "B" es un oligonucleótido que comprende una tercera región (3P) y una cuarta región (4P), estando la tercera región (i) en el extremo alfa del parche "B", e (ii) hibridada a la segunda región del parche "A", estando la cuarta región (i) en el extremo beta del parche "B" e (ii) hibridada a una segunda porción de la cadena, estando la segunda porción de la cadena en el extremo beta de la primera porción de la cadena, en donde la segunda región o la tercera región comprenden además en su extremo beta o en su extremo alfa, respectivamente, una región hibridable que no está hibridada al parche "B" ni al parche de aleta "A", respectivamente.

En la molécula sintética de la Figura 7A, la segunda edición puede además comprender en su extremo beta una región hibridable que no está hibridada al parche "B", como se ilustra en la Figura 7B, o la tercera región comprende además en su extremo alfa una región hibridable que no está hibridada al parche "A", como se ilustra en la Figura 7C.

También se describe una molécula sintética, cuya configuración se ilustra haciendo referencia a la Figura 7D, que comprende una cadena de un ácido nucleico (andamio) y una pluralidad de parches hibridados a la cadena, en donde cada par de parches comprende un parche "A" y un parche "B", en donde, para cada par de parches, (a) cada parche "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región (1P) y una segunda región (2P), estando la primera región (i) en el extremo alfa del parche "A", e (ii) hibridada a una primera porción de la cadena, estando la segunda región (ii) en el extremo beta del parche "A"; (b) cada parche "B" es un oligonucleótido que comprende una tercera región (3P) y una cuarta región (4P), estando la tercera región (i) en el extremo alfa del parche "B", e (ii) hibridada a la segunda región del parche "A", (i) en el extremo beta del parche "B" e (ii) hibridada a una segunda porción de la cadena, estando la segunda porción de la cadena fijada al primero de la primera porción de la cadena, en donde la segunda región

comprende además en su extremo beta una primera región hibridable que no está hibridada al parche "B", y en donde la tercera región comprende además en su extremo alfa una segunda región hibridable que no está hibridada al parche "A".

5 En la molécula sintética de la Figura 7B, cada par de parches puede estar fijada a un par de aletas, como se ilustra en la Figura 7F, en donde cada par de aletas comprende una aleta "A" y una aleta "B", en donde, para cada par de aletas, (a) cada aleta "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región de aleta (1F) y una segunda región de aleta (2F); estando la primera región de aleta situada en el extremo alfa de la aleta "A"; estando la segunda región de aleta (i) situada en el extremo beta de la aleta "A" y (ii) que comprende en su extremo beta una región hibridable que no está hibridada al parche "A", parche "B" o aleta "B"; e ((b) cada aleta "B" es un oligonucleótido que comprende una tercera región de aleta (3F), una cuarta región de aleta (4F), y una quinta región de aleta (5F); estando la tercera región de aleta (i) situada en el extremo alfa de la aleta "B" e (ii) que comprende en su extremo alfa una región hibridable que no está hibridada al parche "A", parche "B" o aleta "A"; estando la cuarta región de aleta (i) situada entre la tercera región de aleta y la quinta región de aleta e (ii) hibridada a la primera región de aleta de la aleta "A"; estando la quinta región de aleta (i) situada en el extremo beta de la aleta "B", e (ii) hibridada a la región hibridable de la segunda región del parche "A".

15 En la molécula sintética de la Figura 7C, cada par de parches puede estar fijado a un par de aletas, como se ilustra en la Figura 7E, en donde cada par de aletas comprende una aleta "A" y una aleta "B", en donde, para cada par de aletas, (a) cada aleta "A" es un oligonucleótido que comprende una primera región de aleta (1F), una segunda región de aleta (2F), y una tercera región de aleta (3F); estando la región de aleta "A" (i) en el extremo alfa de la aleta "A" e (ii) hibridada a la región hibridable de la tercera región del parche "B"; estando la segunda región de aleta situada entre la primera región de aleta y la tercera región de aleta; estando la tercera región de aleta (i) situada en el extremo beta de aleta "A" y (ii) que comprende en su extremo beta una región hibridable que no está hibridada al parche "A", parche "B" o aleta "B", y (b) cada aleta "B" es un oligonucleótido que comprende una cuarta región de aleta (4F) y una quinta región de aleta (5F); estando la quinta región de aleta en (i) situada en el extremo alfa de la aleta "B" e (ii) que comprende en su extremo alfa una región hibridable que no está hibridada al parche "A", parche "B" o aleta "A"; estando la quinta región de aleta en (i) situada en el extremo beta de la aleta "B", e (ii) hibridada a la segunda región de aleta de la aleta "A".

20 En la molécula sintética de las Figuras 7D y 7E, las aletas divididas pueden estar fijadas a uno (*por ejemplo*, (10)), o más (*por ejemplo*, (20) y (30)) oligonucleótidos, como se ilustra en la Figura 7G.

25 Por lo tanto, el uno o más oligonucleótidos pueden ser fijados en la totalidad o a una porción de la aleta "A" individualmente (*por ejemplo*, (10)), la aleta "B" individualmente (*por ejemplo*, (30)), o abarcar la totalidad o una porción de cada una de las aletas "A" y "B" (*por ejemplo*, (20)). Es preferente que tales oligonucleótidos estén covalentemente ligados a uno o monómeros de etiqueta.

30 Las regiones hibridables de las moléculas sintéticas pueden hibridarse a una pluralidad de oligonucleótidos, cada uno de ellos ligado, preferentemente ligado de manera covalente, a por lo menos un monómero de etiqueta, más preferentemente a por lo menos cinco monómeros de etiqueta. En determinadas realizaciones, la totalidad de los oligonucleótidos fijados a un único par de parches comprenden los mismos monómeros de etiqueta, *por ejemplo*, comprenden monómeros de etiqueta que emiten luz con la(s) misma(s) longitud(es); en realizaciones específicas, es preferente que la totalidad de los oligonucleótidos fijados a por lo menos dos, o por lo menos cuatro, pares de parches adyacentes comprendan los mismos monómeros de etiqueta. Uno o más de los oligonucleótidos pueden estar ligados a por lo menos un rótulo de afinidad.

35 En determinadas realizaciones preferidas, los monómeros de etiqueta son fluoróforos o puntos cuánticos.

En las moléculas sintéticas descritas en lo que precede, "alfa" puede referirse a sea 5' o 3', y "β" corresponde a 3' o 5', respectivamente.

40 La región de complementariedad en cada par de parches, o entre un parche dado y una aleta correspondiente, es preferentemente de 20-5.000 nucleótidos. En determinadas realizaciones, el régimen de complementariedad es de 20-100 nucleótidos, o de 5-50 nucleótidos.

En las moléculas sintéticas descritas en lo que precede, cada aleta tiene preferentemente una longitud de 50-5.000 nucleótidos. En determinadas realizaciones, cada aleta es de 50-5.000 nucleótidos de longitud.

45 Las moléculas sintéticas descritas en lo que precede pueden además comprender una región específica de la diana que se liga a una molécula diana. La región específica de la diana puede fijarse en el extremo beta o alfa de la cadena.

En determinadas realizaciones, la molécula sintética descrita arriba comprende por lo menos diez pares de parches, o por lo menos cincuenta pares de parches.

50 En las moléculas sintéticas descritas en lo que precede, la cadena, o andamio, puede ser un vector linealizado, tal como M13 linealizado.

La molécula sintética descrita arriba puede además comprender (a) una primera región de fijación de etiqueta a la que se hallan fijados (directa o indirectamente) uno o más monómeros de etiqueta que emiten luz que constituye una primera señal; (b) una segunda región de fijación de etiqueta, que no se superpone con la primera región de fijación de etiqueta, a la que se hallan fijados uno o más monómeros de etiqueta que emiten luz que constituye una segunda señal; (c) una tercera región de fijación de etiqueta, que no se superpone a las regiones de fijación de etiqueta primera y segunda, a la que se hallan fijados uno o más monómeros de etiqueta que emiten luz que constituye una tercera señal; en donde cada región de fijación comprende una pluralidad de pares de parches; en donde las señales primera y segunda son espectralmente distinguibles; en donde las señales segunda y tercera son espectralmente distinguibles; en donde las señal primera y segunda no son especialmente resolubles bajo condiciones que pueden utilizarse para detectar las señales primera, segunda y tercera; en donde las señales segunda y tercera no son espacialmente resolubles bajo condiciones y pueden utilizarse para detectar las señales primera, segunda y tercera; y en donde las identidades de las señales primera, segunda, y tercera y las ubicaciones de las señales primera y tercera entre sí constituyen por lo menos parte de un código que identifica la molécula diana.

#### 5.4 Monómeros de etiqueta

El nanoindicadores puede etiquetarse con cualquiera de entre una variedad de monómeros de etiqueta, tales como un radioisótopo, fluorocromo, tinte, enzima, nanopartícula, marcador quimioluminiscente, biotina, u otro monómero conocido en la especialidad que puede detectarse directamente (*por ejemplo*, mediante emisión de luz) o indirectamente (*por ejemplo*, mediante la ligación de un anticuerpo fluorescentemente etiquetado). En términos generales, una o más de las regiones de fijación de etiqueta en el nanoindicador se etiqueta con uno o más monómeros de etiqueta, y las señales emitidas por los monómeros de etiqueta fijados a las regiones de fijación de etiqueta de un nanoindicador constituye un código que identifica la diana a la que se liga la región específica para la diana del nanoindicador. En determinadas realizaciones, la falta de una señal dada desde la región de fijación de etiqueta (es decir, una mancha “oscura”) también puede constituir parte del código de nanoindicador. Un ejemplo de una mancha oscura se ilustra en la posición 12 del nanoindicador en la Figura 1 A.

Los radioisótopos son un ejemplo de monómeros de etiqueta quien pueden utilizarse.

Son varios los radioisótopos que pueden utilizarse como monómeros de etiqueta para etiquetar nucleótidos o proteínas, e incluyen, por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ , y  $^{125}\text{I}$ . Estos radioisótopos tienen diferentes semividas, tipos de desintegración, y niveles de energía que pueden ajustarse para satisfacer las necesidades de un experimento en particular. Por ejemplo,  $^3\text{H}$  es un emisor de baja energía que resulta en bajos niveles de segundo plano; sin embargo esta baja energía también resulta en prolongados periodos de tiempo para la autorradiografía. En el comercio pueden obtenerse ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y aminoácidos etiquetados. Se dispone de nucleótidos que están radiactivamente etiquetados en el primer grupo, o en un grupo fosfato, o en el tercer grupo, o grupo fosfato. Por ejemplo, tanto  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dATP}$  como  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{dATP}$  pueden obtenerse en el comercio. Además, diferentes actividades específicas para nucleótidos radiactivamente etiquetados también pueden obtenerse en el comercio y se los puede ajustar por diferentes experimentos.

Otro ejemplo de monómeros de etiqueta que pueden utilizarse son los fluoróforos. Varios fluoróforos pueden utilizarse como monómeros de etiqueta para etiquetar nucleótidos e incluyen por ejemplo fluoresceína, tetrametilrodamina, y Texas Red. Se conocen varios fluoróforos diferentes, y se siguen produciendo, que abarca la totalidad del espectro.

Asimismo, se han producido diferentes formulaciones del mismo fluoróforo para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, la fluoresceína puede utilizarse en su forma de isotiocianato (FITC), como isómero mixto o como formas isoméricas de carboxifluoresceín succinimidil éster (FAM), o como formas isoméricas diclorotriazina de fluoresceína (DTAF). Estos monómeros son químicamente distintos entre sí, pero emiten luz con un pico entre 515 y 520 nm, por lo que generan una señal similar. Además de las modificaciones químicas de fluoresceína, se han sintetizado fluoróforos completamente diferentes que tienen picos de emisión igual es un similares a los de la fluoresceína. Por ejemplo, el tinte Oregon Green tiene una excitación virtualmente superimponible y un espectro de emisión comparable con la de la fluoresceína. Otros fluoróforos tales como Rhodol Green y Rhodamine Green presentan pequeñas diferencias en cuanto al corrimiento de sus picos de emisión por lo que también funcionan funcionalmente como sustitutos de la fluoresceína. Además, se han desarrollado diferentes formulaciones o tintes relacionados centrados en otros fluoróforos que emiten luz en otras partes del espectro.

También se dispone de monómeros no radioactivos y no fluorescentes. Por ejemplo, la biotina puede fijarse directamente a los nucleótidos y detectarse mediante ligación de afinidad específica y elevada a la avidina o estreptavidina a la que ha sido acoplada químicamente a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica (tal como fosfatasa, luciferasa, o peroxidasa). Los nucleótidos etiquetados con digoxigenina también pueden utilizarse de manera similar para la detección no isotópica de ácidos nucleicos. En el comercio se dispone de nucleótidos biotinilados y etiquetados con digoxigenina.

También es posible utilizar partículas muy pequeñas, denominadas nanopartículas, como monómeros de etiqueta para etiquetar ácidos nucleicos. El tamaño de estas partículas puede variar entre 1 a 1.000 nm e incluyen diversas estructuras químicas tales como partículas de oro y plata y puntos cuánticos.

5 Cuando se las irradia con luz blanca angularmente incidente, las nanopartículas de plata y oro con un tamaño de entre 40 y 120 nm dispersarán la luz monocromática con una elevada intensidad. La longitud de onda de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula. De cuatro a cinco de partículas diferentes en estrecha proximidad dispersarán la luz monocromática, lo que, cuando se superpone, resultará en un color específico único. Las partículas son fabricadas por compañías tales como Genicon Sciences. Las partículas de plata u oro derivados pueden ser fijados a un amplio espectro de moléculas que incluyen proteínas, anticuerpos, pequeñas moléculas, ligandos de receptor, y ácidos nucleicos. Por ejemplo, la superficie de la partícula puede derivarse químicamente para permitir su fijación a un nucleótido.

10 Otro tipo de nanopartícula que puede utilizarse como un monómero de etiqueta son los puntos cuánticos. Los puntos cuánticos son cristales fluorescentes con un día de 1 a 5 nm que pueden excitarse mediante una amplia gama de longitudes de onda de luz. Estos cristales emiten luz, tal como luz monocromática, con una longitud de onda que depende de su composición y uso. Los puntos cuánticos tales como CdSe, ZnSe, InP, o InAs poseen propiedades ópticas únicas en su género.

15 Es posible crear muchas docenas de clases de partículas de acuerdo con el número de clases de tamaño de los cristales de punto cuántico. Las clases de tamaño de los cristales se crea sea: 1) mediante un estrecho control de los parámetros para la formación de cristales para crear una clase de tamaño deseada para las partículas; o 2) mediante la creación de lotes de cristales bajo parámetros laxos para la formación de cristales, seguido por selección de acuerdo con el tamaño y/o longitudes de onda de emisión deseados. La utilización de puntos cuánticos para etiquetar partículas, en el contexto de la presente invención, es nuevo, pero es antiguo en la técnica de los semiconductores. 20 Dos ejemplos de referencias anteriores en los que hay puntos cuánticos embebidos dentro de capas epitaxiales de silicón intrínsecos de dispositivos emisores/detectores de luz son las Patentes US N.ºs 5.293. 050 y 5.354.707 asignadas a Chappie Sokol, *et al.*.

25 En realizaciones específicas, una o más de las regiones de fijación de etiqueta en el nanoindicador están etiquetadas con uno o más tintes emisores de luz, y cada región de fijación de etiqueta contiene, directa o indirectamente, uno o más monómeros de etiqueta. La luz emitida por los tintes puede ser luz visible o luz invisible, tal como luz ultravioleta o luz infrarroja. En realización dadas como ejemplos, el tinte es un tinte de tipo FRET (fluorescence resonance energy transfer, transferencia de energía de resonancia por fluorescencia); un tinte de santeño, tal como fluoresceína y rodamina; un tinte que tiene un grupo amino en la posición alfa o beta (tal como un tinte de naftilamina, 1-dimetilaminonafil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftaleno sulfonato y 2-p-touidínil-6-naftalen sulfonato); un tinte que tiene una 3-fenil-7-isocianatocumarina; una acridina, tal como 9-isotiocianatoacridina y acridina naranja; un pireno, un 30 bensoxadiazol y un stilbeno; un tinte que 3-(s-carboxipentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CYA); 6-carboxi fluoresceína (FAM); 5&6-carboxirodamina-110 (R110); 6-carboxirodamina-6G (R6G); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA); 6-carboxi-X-rodamina (ROX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); ALEXA Fluor™; Cy2; Texas Red y Rhodamine Red; 35 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX); 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína (ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3.5; Cy5; Cy5.5; Cy7; y Cy7.5; Alexa Fluor 350; Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; o Alexa Fluor 647.

Los monómeros de etiqueta pueden incorporarse en un nanoindicador en diferentes etapas de su ensamble, o en un componente (*por ejemplo*, una "aleta" del nanoindicador antes de su ensamble en el nanoindicador).

40 Un monómero de etiqueta puede fijarse directamente a un nucleótido para lo cual se utilizan métodos bien conocidos en la técnica. También es posible modificar los nucleótidos químicamente o derivárselos para su fijación a un monómero de etiqueta. Por ejemplo, es posible fijar un monómero fluorescente tal como una molécula de fluoresceína a dUTP (desoxiuridina-trifosfato) para lo cual se utiliza un grupo aminoalquilino de cuatro átomos. Cada monómero de etiqueta se fija a un nucleótido que constituye un complejo: monómero de etiqueta-nucleótido.

45 Este complejo: monómero de etiqueta-nucleótido puede incorporarse en ácidos nucleicos (por ejemplo, un parche de ADN o un oligonucleótido de detección) de diversas maneras. Por ejemplo, es posible incorporar un complejo: monómero de etiqueta-nucleótido en solamente una ubicación dentro de un ácido nucleico o en dos o más ubicaciones dentro de un ácido nucleico.

50 Se dispone de fluoróforos amina-reactivos y tiol-reactivos, y se los utiliza para etiquetar nucleótidos y biomoléculas. En términos generales, los nucleótidos se etiquetan fluorescentemente durante su síntesis química, por ejemplo, la incorporación de aminas o tioles durante las síntesis de los nucleótidos permite la adición de fluoróforos. Los nucleótidos etiquetados fluorescentemente pueden encontrarse en el comercio. Por ejemplo, se dispone de uridina y de trifosfatos de desoxiuridina que están conjugados a diez fluoróforos que abarcan el espectro.

55 Es posible fijar en primera instancia un nucleótido a un monómero de etiqueta y a continuación incorporárselo en un ácido nucleico. Como alternativa, es posible etiquetar un ácido nucleico existente fijando un monómero de etiqueta a un nucleótido dentro del ácido nucleico. Por ejemplo es posible incorporar nucleósidos UTP aminoalil- ("AA-") modificados en el producto de ARN durante la transcripción. En diversas realizaciones, 20% o más de los nucleótidos UTP en una reacción de transcripción para generar partes de ARN han sido modificados por AA. En diversas realizaciones, aproximadamente 20%-100%, 20%-80%, 30-80%, 40-60% o 50%-75% de UTPs en una reacción de

transcripción están modificados por AA, en una realización preferida, aproximadamente 50% de los UTPs en una es la transcripción están modificados en AA.

Además, por ejemplo, es posible encontrar diferentes tipos de complejos: monómero de etiqueta-nucleótido en un ácido nucleico individual, en donde uno de los componentes del código de nanoindicador comprende más de un tipo de señal.

Los tintes fluorescentes que pueden ligarse directamente a nucleótidos también pueden utilizarse como monómeros de etiqueta. Por ejemplo, FAM, JOE, TAMRA, y ROX son tintes fluorescentes aminorreactivos que han sido fijados a nucleótidos y que se utilizan en el secuenciación automatizado de ADN. Estos nucleótidos fluorescentemente etiquetados, por ejemplo ROX-ddATP, ROX-ddCTP, ROX-ddGTP y ROX-ddUTP, se encuentran disponibles en el comercio.

Otros tipos de monómeros de etiqueta que pueden utilizarse para etiquetar un nanoindicador son los puntos cuánticos. Debido a su tamaño muy pequeño los puntos cuánticos pueden acoplarse en los oligonucleótidos directamente sin afectar la solubilidad ni utilización del oligonucleótido. En una realización preferida, solamente una molécula de oligonucleótido se acopla a cada nanopartícula. Para sintetizar un complejo: oligonucleótido- nanopartícula en una relación 1:1 mediante química de lote convencional, tanto el oligonucleótido como la nanopartícula requieren un único grupo reactivo de diferentes tipos que pueden hacerse reaccionar entre sí. Por ejemplo, si un oligonucleótido tiene un grupo amino y una nanopartícula tiene un grupo aldehído, estos grupos pueden reaccionar entre sí de manera de formar una base de Schiff. Es posible derivar un oligonucleótido para fijar un único grupo amino u otro grupo funcional utilizando métodos químicos bien conocidos de la técnica. Sin embargo, si se deriva una nanopartícula, se lo recubre con un reactivo químico siendo el resultado del reconocimiento de la superficie entera con diversos grupos funcionales.

En la presente se describe un método para acoplar un oligonucleótido a una nanopartícula mediante el acoplamiento químico del oligonucleótido sobre una superficie sólida tal como el soporte de vidrio utilizado para la síntesis de los oligonucleótidos.

Por ejemplo, es posible utilizar resinas disponibles en el comercio para la síntesis de los oligonucleótidos tales como vidrio poroso controlado por alquilamino de cadena larga (Icaa CPG, long chain alquilamino controlled pore glass).

Como alternativa, es posible utilizar una superficie plana tal como un slide de microscopio derivado. La densidad de superficie de las cadenas de oligonucleótidos nacientes debería ser menor que el diámetro de la nanopartícula. Esto puede lograrse sea seleccionando un soporte de vidrio con una baja densidad de los grupos reactivos, o mediante la utilización de un reactivo diluido para la primera etapa de la síntesis del oligonucleótido de manera tal que la superficie no se sature. Otro punto a tener en cuenta cuando se utilicen las matrices de vidrio estándar para la síntesis de los oligonucleótidos consiste en utilizar poros con un diámetro superior al diámetro de la nanopartícula, a efectos de asegurar el flujo de los reactivos. Por ejemplo, es posible sinterizar un oligonucleótido en una base diluida con respecto al soporte sólido, por ejemplo, un décimo de una síntesis normal, para asegurar una buena separación de los oligonucleótidos sobre el soporte de vidrio. Una vez que el oligonucleótido se haya sintetizado mediante un grupo reactivo funcional, por ejemplo, un grupo amino, se hacen pasar las nanopartículas derivadas sobre el soporte de vidrio para que reaccionen con los oligonucleótidos. Es posible elegir un soporte de vidrio con poros suficientemente grandes para obtener una obturación por las nanopartículas. Por ejemplo, pueden utilizarse poros con un tamaño de aproximadamente 200 nm. Una vez que se haya completado la reacción, es posible bloquear los grupos de la nanopartícula que hayan quedado sin reaccionar, y desacoplar los complejos del soporte de vidrio.

## 5.5 El código del nanoindicador

### 5.5.1 Nanoindicadores duales

Un nanoindicador cuyos componentes existen en dos entidades moleculares se conoce como un nanoindicador dual. En un nanoindicador dual, generalmente cada componente contiene una secuencia específica para la diana, que mejora la especificidad de la cinética de unión del nanoindicador a su diana. Las dos secuencias específicas para la diana diferentes se diseñan o seleccionan de modo que cada una reconoce una porción diferente de una molécula diana.

Las Figuras 1A-1C ilustran métodos descritos que implican nanoindicadores duales. En las Figuras 1A y 1B, cada uno de los dos componentes del nanoindicador está marcado, de tal manera que el código espectral del nanoindicador se forma solo cuando los dos componentes del nanoindicador se combinan después de la unión del nanoindicador dual a su molécula diana. Sin embargo, en un nanoindicador dual, no es necesario que ambos componentes estén marcados. Por ejemplo, como se representa en la Figura 1C, un componente de un nanoindicador dual está marcado con el código nanoindicador, y el otro componente está unido a una etiqueta de afinidad (flecha) que es útil para inmovilizar el nanoindicador para la extensión y visualización.

### 5.5.2 Registros

El término "registro" se refiere a un conjunto de regiones de unión de etiqueta alternadas (cada dos). Los registros son útiles cuando es deseable marcar regiones de unión de etiqueta adyacentes sin una región espaciadora y donde la

señal que emana de las regiones de unión de etiqueta adyacentes no se puede resolver espacialmente usando el método de detección deseado. De este modo, las señales detectadas con el uso de un registro son las que forman las regiones de unión de etiquetas alternadas, más que adyacentes. Las señales detectadas a partir de una pluralidad de registros (por ejemplo, que juntas son todas las regiones de unión de etiqueta) se pueden combinar para formar un código de nanorregistro. Generalmente, cuando se usan registros, las regiones de unión de etiquetas adyacentes están marcadas con monómeros marcadores espectralmente distinguibles.

Los ejemplos de registros se ilustran en las Figuras 3 y 5. Por ejemplo, en las Figuras 3A-3B, existen ocho regiones de unión de etiqueta 1-8. Las regiones de unión de etiqueta alternadas 1, 3, 5 y 7 forman un registro, y regiones de unión de etiqueta 2, 4, 6 y 8 forman otro registro. En la Figura 3 A, solo uno de los registros (1, 3, 5 y 7) está marcado; en la Figura 3B, ambos registrados están marcados.

#### 5.6 Etiquetas de afinidad

Se puede usar una variedad de etiquetas de afinidad conocidas en la técnica para purificar y/o inmovilizar nanoindicadores. Cuando se usa una etiqueta de afinidad para inmovilizar un nanoindicador con el propósito de detección o formación de imágenes, se puede denominar en la presente como un "anclaje". En una realización preferida, un anclaje de biotina está unido a nanoindicador, lo que permite la inmovilización del nanoindicadores en un portaobjeto recubierto con estreptavidina.

A continuación se proporcionan ejemplos no limitantes de etiquetas de afinidad adecuadas. Se debe entender que la mayoría de las etiquetas de afinidad pueden servir para fines duales: tanto como anclajes para la inmovilización de los nanoindicadores y etiquetas para la purificación de los nanoindicador (ensamblados total o solo parcialmente) o sus componentes.

En ciertas realizaciones, la etiqueta de afinidad es un monómero de proteína. Los ejemplos de monómeros de proteína incluyen pero sin limitación, las regiones constantes de la inmunoglobulina (ver Petty, 1996, Metal-chelate affinity chromatography, en Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel *et al.*, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience), glutatión S-transferasa (GST; Smith, 1993, Methods Mol. Cell Bio. 4:220-229), la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (Guan *et al.*, 1987, Gene 67:21-30), y varios dominios de unión a celulosa (Patentes U.S. Nros 5.496.934, 5.202.247, 5.137.819, Tomme *et al.*, 1994, Protein Eng. 7: 117-123), etc. Otras etiquetas de afinidad son reconocidas por los compañeros de unión específicos y por lo tanto facilitan el aislamiento y la inmovilización por afinidad de unión al compañero de unión, que se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. Por ejemplo, la etiqueta de afinidad puede ser un epítipo, y el compañero de unión un anticuerpo. Los ejemplos de tales epítipos incluyen pero sin limitación, el epítipo FLAG, el epítipo myc en los aminoácidos 408-439, el epítipo de hemaglutinina del virus de la gripe (HA) o digoxigenina (DIG). En otras realizaciones, la etiqueta de afinidad es una secuencia de proteína o aminoácidos que es reconocida por otra proteína o aminoácido, por ejemplo la avidina/estreptavidina y la biotina.

En ciertos casos, la etiqueta de afinidad se puede usar para marcar un nanoindicador además de purificar o inmovilizar el nanoindicador. Como se apreciará por los expertos en la técnica, se pueden usar muchos métodos para obtener la región codificadora de las etiquetas de afinidad, que incluyen, pero sin limitación, clonación de ADN, amplificación de ADN y métodos sintéticos. Algunas de las etiquetas de afinidad y reactivos para su detección y aislamiento están disponibles en el comercio.

#### 5.7 Secuencias específicas de la diana

El término "secuencia específica de la diana" se refiere a una entidad molecular que es capaz de unirse a una molécula diana. En el contexto de un nanoindicador, la secuencia específica de la diana se une al andamio de nanoindicador. La secuencia específica de la diana generalmente es una secuencia de aminoácidos (*es decir*, una secuencia de polipéptidos o péptidos) o una secuencia de ácidos nucleicos. En realizaciones específicas, cuando la secuencia específica de la diana es una secuencia de aminoácidos, la secuencia específica de la diana es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab' de anticuerpo, un anticuerpo Fv de cadena única.

La secuencia específica de la diana es con preferencia a secuencia de ácidos nucleicos, y con máxima preferencia dentro de un oligonucleótido que está unido de modo covalente (*por ejemplo*, por ligamiento) o unido de modo no covalente (*por ejemplo*, por hibridación) al andamio del nanoindicador. Una secuencia de ácidos nucleicos específica de la diana con preferencia tiene al menos 15 nucleótidos de longitud, y con más preferencia tiene al menos 20 nucleótidos de longitud. En realizaciones específicas, la secuencia específica de la diana tiene aproximadamente 10-500, 20-400, 30-300, 40-200, o 50-100 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la secuencia específica de la diana tiene aproximadamente 30-70, 40-80, 50-90, o 60-100, 30-120, 40-140, o 50-150 nucleótidos de longitud.

#### 5.8 Moléculas diana

El término molécula diana se refiere a una molécula que se detecta o mide mediante la unión de un nanoindicador marcado cuya secuencia específica de la diana reconoce (son compañeros de unión específicos a estas). Una molécula diana puede ser, pero sin limitación, cualquiera de los siguientes: ADN, ADNc, ARN, ARNm, péptido, un polipéptido/proteína (por ejemplo, una proteína bacteriana o viral o un anticuerpo), un lípido, un carbohidrato, una glicoproteína, un glicolípido, una molécula pequeña, un monómero orgánico o un fármaco. Generalmente, una

molécula diana es una molécula natural o un ADNc de una molécula natural o el complemento de dicho ADNc.

Una molécula diana puede ser parte de una muestra biomolecular que contiene otros componentes o puede ser el componente único o principal de la muestra. Una molécula diana puede ser un componente de una célula o tejido entero, un extracto de célula o tejido, un lisado fraccionado de esto o una molécula sustancialmente purificada. La molécula diana se puede unir en solución o en fase sólida, que incluye, por ejemplo, a una superficie sólida tal como un chip, micromatriz y o una perla. Además, la molécula diana puede tener una estructura o secuencia conocida o desconocida.

En ciertas realizaciones específicas, esta molécula diana no es un cromosoma. En otras realizaciones específicas, la molécula diana es no mayor de 1.000 kb (o 1 mb) de tamaño, no mayor de 500 kb de tamaño, no mayor de 250 kb de tamaño, no mayor de 175 kb de tamaño, no mayor de 100 kb de tamaño, no mayor de 50 kb de tamaño, no mayor de 20 kb de tamaño, o no mayor de 10 kb de tamaño. En aún otras realizaciones específicas, la molécula diana se aísla de su medio celular.

En realizaciones específicas no limitantes, la molécula diana es un antígeno tal como alfa-fetoproteína, alfa-1 antitripsina, a-2 macroglobulina, adiponectina, apolipoproteína-A-1, apolipoproteína-CIII, apolipoproteína-H, BDNF, (3-2 microglobulina, proteína C reactiva, calcitonina, antígeno de cáncer 19-9, antígeno de cáncer 125, CEA, CD 40, ligando de CD40, complemento 3, CK-MB, EGF, ENA-78, endotelina-1, enrage, eotaxina, eritropoyetina, Factor VII, FABP, ferritina, FGF básico, fibrinógeno, G - CSF, GST, GM - CSF, hormona del crecimiento, haptoglobina, ICAM-1, IFN-gamma, IgA, IgE, IGF-1, IgM, IL-1a, IL-1p, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-13, IL-15, IL-16, insulina, leptina, lipoproteína (a), Linfotactina, MCP-1, MDC, MIP-1a, MIP-1p, MMP-2, MMP-3, MMP-9, mieloperoxidasa, mioglobina, PAI-1, PAP, PAPP-A, SGOT, SHBG, PSA (libre), RANTES, amiloide sérico P, factor de células madre, TBG, trombotopoyetina, TIMP-1, factor tisular, TNF-a, TNF-p, TNF RII, TSH, VCAM-1, VEGF, o vWF.

En algunas realizaciones, la molécula diana es una molécula relacionada con la autoinmunidad tal como ASCA, glicoproteína p-2, Clq, Prot. B centrómero, colágeno tipo 1, colágeno tipo 2, colágeno tipo 4, colágeno tipo 6, Cyto P450, ADN ds, histona, histona HI, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4, HSC-70, HSP-32, HSP HSP-90, HSP-90P, insulina, JO-1, mitocondrial, mieloperoxidasa, células de islotes pancreáticos, PCNA, PM-1, PR3, P ribosómico, RNP-A, RNP-C, RNP, Sel-70, Smith, SSA, SSB, T3, T4, tiroglobulina, tTG, (enfermedad celíaca), o microsoma tiroideo.

En algunas realizaciones, la molécula diana es un componente aislado de una enfermedad infecciosa, tal como toxina de cólera, toxina de cólera P, *Campilobacter jejuni*, Citomegalovirus, toxina de difteria, Epstein-Barr NA, Epstein-Barr EA, Epstein-Barr VGA, *Helicobacter pilori*, núcleo de HBV, envoltura del VHB, HBV de superficie (Ad), HBV de superficie (Ay), núcleo de HCV, HCV NS3, HCV NS4, HCV NS5, hepatitis A, hepatitis D, HEV orf2 3KD, HEV orf2 6 KD, HEV orf 3KD, HIV-1 p24, HIV-1 gp41, HIV-1 gp120, HPV, HSV-1/2, HSV-1 gD, HSV-2 gD, HTLV-1/2, gripe A, gripe A H3N2, gripe B, *Leishmania donovani*, enfermedad de Lyme, paperas, *M. pneumonia*, *M. tuberculosis*, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, virus de polio, RSV, Rubeola, estreptolisina O, toxina tetánica, *T. pallidum* 15kD, *T. pallidum* p47, *T. cruzi*, Toxoplasma, Varicella zoster.

#### 5.9 Poblaciones de nanoindicadores

En la presente también se describen poblaciones de nanoindicadores o unidades de etiqueta de nanoindicadores, por ejemplo bibliotecas de nanoindicadores o unidad de etiqueta de nanoindicador, que contienen al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 750, o al menos 1.000 nanoindicadores o unidades de etiqueta de nanoindicador únicos, respectivamente. Como se usa en la presente, "único" cuando se usa en referencia a un nanoindicador o unidades de etiqueta de nanoindicador dentro de una población significa un nanoindicador o unidad de etiqueta que tiene un código que lo distingue de otros nanoindicadores o unidades de etiqueta de la misma población.

En variantes específicas, la poblaciones de nanoindicadores contienen al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000 o al menos 50.000 nanoindicadores o unidades de etiqueta de nanoindicador únicos. Los nanoindicadores en una población de nanoindicadores pueden ser nanoindicadores singulares, nanoindicadores duales, o una combinación de estos. Los nanoindicadores pueden estar marcados o no marcados.

El tamaño de una población de nanoindicadores y la naturaleza de las secuencias específicas de la diana de los nanoindicadores dentro de estos dependerá del uso deseado del nanoindicador. Se pueden obtener poblaciones de nanoindicadores en las que la secuencias específicas de la diana corresponden a los marcadores de un tipo celular dado, que incluyen un tipo celular enfermo. En ciertas realizaciones, se generan poblaciones de nanoindicadores en las que las secuencias específicas de la diana representan al menos 0,1%, al menos 0,25%, al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, o al menos 70% del tipo diferente de transcritos en una célula. En ciertas realizaciones, se generan poblaciones de nanoindicadores en las que las secuencias específicas de la diana representan al menos 0,1%, al menos 0,25%, al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2%, al

menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, o al menos 70% de los diferentes genes en una célula. En aún otras realizaciones, se generan poblaciones de nanoindicadores en las que al menos algunas de las secuencias específicas de la diana representan transcritos raros en una célula o tejido. Tales poblaciones de nanoindicadores con preferencia representan al menos 5 transcritos raros. En realizaciones específicas, tales poblaciones de nanoindicadores representan al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 transcritos raros. En una realización específica, la célula o tejido es una célula o tejido de mamífero, y con más preferencia es una célula o tejido humano.

En ciertas realizaciones, la población de nanoindicadores es una población de nanoindicadores de diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, se puede generar una población de nanoindicadores de diagnóstico que sea útil para el análisis de productos sanguíneos, en los que las secuencias específicas de la diana se unen a los ácidos nucleicos de virus contaminantes tales como la hepatitis B, hepatitis C y el virus de la inmunodeficiencia humana. Alternativamente, la población de nanoindicadores de diagnóstico puede contener secuencias específicas de la diana que corresponden a marcadores de enfermedades celulares, tales como antígenos tumorales. Las poblaciones de nanoindicadores pronósticos generalmente incluyen marcadores específicos de la diana que representan etapas diferentes de una enfermedad dada tal como cáncer. Mediante la selección de las secuencias específicas de la diana apropiadas, se puede usar una población de nanoindicadores tanto para diagnosticar como para pronosticar la enfermedad.

#### 5.10 Muestras biomoleculares

Los nanoindicadores se pueden usar para detectar moléculas diana en cualquier muestra biomolecular. Como será apreciado por los expertos en la técnica, la muestra puede comprender cualquier número de cosas, que incluyen, pero sin limitación, células (que incluyen células primarias y líneas celulares cultivadas), tejidos y fluidos corporales (que incluyen, pero sin limitación, sangre, orina, suero, linfa, bilis, líquido cefalorraquídeo, fluido intersticial, humor acuoso o vítreo, calostro, esputo, líquido amniótico, saliva, secreciones anal y vaginal, transpiración y semen), un transudado, un exudado (por ejemplo, fluido obtenido de un absceso o de cualquier otro sitio de infección o inflamación) o fluido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad tal como artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artritis séptica) de prácticamente cualquier organismo, se prefieren las muestras de mamíferos y se prefiere particularmente las muestras humanas; muestras ambientales (que incluyen, pero sin limitación, muestras de aire, agrícolas, agua y suelo); muestras de agentes de guerra biológica; muestras de investigación que incluyen fluidos extracelulares, sobrenadantes extracelulares de cultivos celulares, cuerpos de inclusión en bacterias, compartimentos celulares, periplasma celular, compartimiento de mitocondrias, etc.

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

Las muestras biomoleculares pueden ser "nativas", es decir, no sujetas a manipulación o tratamiento, o "tratadas", que pueden incluir cualquier número de tratamientos, que incluyen exposición a agentes candidatos que incluyen fármacos, ingeniería genética (por ejemplo, la adición o supresión de un gen), etc.

#### 5.11 Separación de monómeros marcadores

Además de detectar una señal total generada a partir de un nanoindicador marcado, la invención proporciona la determinación de la localización espacial de las señales que emanan de los monómeros marcadores (es decir, manchas) en un nanoindicador, cada mancha representa la señal agregada de los monómeros marcadores unidos a una región de unión de etiqueta dada. Una mancha puede contener señales de la misma longitud de onda o de diferentes longitudes de onda. En consecuencia, la naturaleza de las manchas en un nanoindicador y su ubicación constituyen el código del nanoindicador.

Cualquiera de una variedad de medios se puede utilizar para "extender" el nanoindicador para separar las manchas individuales. Por ejemplo, un nanoindicador se puede extender usando una técnica de extensión de flujo (Henegariu et al, 2001, *Biotechniques* 31: 246-250), una técnica de menisco de retroceso (Yokota et al., 1997, *Nuc Acids Res.* 25: 1064-1070) o una técnica de electroextensión (Matsuura et al., 2001, *Nuc. Acids Res.* 29: E79).

El uso de técnicas de extensión de flujo, menisco de retroceso o electro-extensión permite la separación de las regiones de unión de etiqueta dentro de un nanoindicador de manera que se pueda determinar espacialmente dónde se ubica una señal particular en el nanoindicador. Por lo tanto, los nanoindicadores únicos que tienen la misma combinación de monómeros marcadores y la misma señal total se pueden diferenciar entre sí sobre la base de la ubicación de los monómeros marcadores dentro del nanoindicador.

Esta capacidad para localizar la posición de una región o mancha de unión de etiqueta dentro de un nanoindicador permite que la posición de la señal emitida por los monómeros marcadores en cada región de unión de etiqueta se use como una característica distintiva cuando se genera un conjunto de nanoindicadores únicos. Por lo tanto, se puede generar un conjunto complejo de nanoindicadores usando la misma combinación de monómeros marcadores de

partida mediante la variación de las posiciones de los monómeros marcadores dentro de un nanoindicador.

Antes de extender un nanoindicador, es preferente inmovilizar el nanoindicador a una superficie sólida usando una etiqueta de afinidad, como se describe en la Sección 5.6 anterior. En ciertos aspectos de la invención, un extremo de un nanoindicador se inmoviliza, ya sea a través de la unión específica o no específica a una superficie sólida, el nanoindicador se extiende, y luego el otro extremo del reportero se inmoviliza, ya sea a través de una unión específica o no específica a una superficie sólida. Por consiguiente, el nanoindicador se "congela" en su estado estirado, o extendido, para facilitar la resolución del código de los nanoindicadores mediante la detección y/o visualización de imágenes de las señales emitidas por los monómeros marcadores unidos a un nanoindicador y sus posiciones relativas entre sí. Estos aspectos de la invención se describen a continuación.

5

## 10 **5.12 Nanoindicadores**

En los métodos, los nanoindicadores son ciertos tipos de macromoléculas. En ciertas realizaciones, la macromolécula es una macromolécula que es capaz de extenderse en los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, la macromolécula es capaz de ser inmovilizada en una o dos porciones como se describe en las secciones siguientes.

15

En ciertas realizaciones, el nanoindicador es un polisacárido, un polipéptido o un polinucleótido. Los polinucleótidos útiles incluyen ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos y otros polinucleótidos conocidos por los expertos en la técnica.

20

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

25

30

El nanoindicador puede ser un nanoindicador nativo como es entendido por los expertos en la técnica, o el nanoindicador puede ser un nanoindicador no nativo. En ciertas realizaciones, cuando el nanoindicador es un polipéptido, el nanoindicador puede comprender solo aminoácidos naturales, o el nanoindicador puede comprender aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. Los otros aminoácidos pueden ser cualquiera de los aminoácidos, o derivados o análogos de estos, conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, cuando el nanoindicador es un polinucleótido, el polinucleótido puede comprender solo nucleótidos naturales, o el polinucleótido puede comprender nucleótidos naturales y nucleótidos no naturales. En ciertas realizaciones, cuando el nanoindicador es a polisacárido, el polisacárido puede comprender solo sacáridos naturales, o el polisacárido puede comprender sacáridos naturales y sacáridos no naturales. En ciertas realizaciones, los polímeros pueden comprender solo monómeros no naturales. En realizaciones adicionales, el nanoindicador puede comprender una pluralidad de clases de monómeros, tales como aminoácidos, nucleótidos y/o sacáridos.

35

40

En ciertas realizaciones, el nanoindicador comprende solo una cadena de monómeros ligados covalentemente primaria. Por ejemplo, cuando el nanoindicador es un polipéptido, en ciertas realizaciones, el nanoindicador comprende solo una cadena de aminoácidos primaria. Cuando el nanoindicador es un polinucleótido, en ciertas realizaciones, el nanoindicador es de cadena simple. En realizaciones adicionales, el nanoindicador comprende dos cadenas de monómeros ligados covalentemente primarias. Por ejemplo, cuando el nanoindicador es un polipéptido, en ciertas realizaciones, el nanoindicador comprende dos cadenas de aminoácidos primarias. Cuando el nanoindicador es un polinucleótido, en ciertas realizaciones, el nanoindicador comprende dos cadenas de polinucleótido; en ciertas realizaciones, el nanoindicador puede ser de cadena doble, en parte o en su totalidad. En realizaciones adicionales, el nanoindicador comprende tres o más cadenas de monómeros ligados covalentemente primarias. Por ejemplo, cuando el nanoindicador es un polipéptido, en ciertas realizaciones, el nanoindicador comprende tres cadenas de aminoácidos primarias. Cuando el nanoindicador es un polinucleótido, en ciertas realizaciones, el nanoindicador comprende tres cadenas de aminoácidos. Por ejemplo, el nanoindicador puede comprender tres cadenas F1, X y F2 donde una porción de la cadena X es complementaria con la cadena F1 y una porción de la cadena X es complementaria con la cadena F2. Se ilustra un ejemplo en la Figura 13 A. En ciertas realizaciones, el nanoindicador comprende más de tres cadenas de monómeros ligados covalentemente primarias.

45

50

55

Ventajosamente, un nanoindicador puede comprender una o más etiquetas que facilitan la detección, formación de imágenes o identificación del nanoindicador por técnicas conocidas por los expertos en la materia. La etiqueta puede ser cualquier resto detectable conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos de etiquetas para nanoindicadores incluyen isótopos detectables, radioisótopos, fluoros, colorantes, enzimas, ligandos, receptores, antígenos,

anticuerpos, lectinas, carbohidratos, secuencias de nucleótidos y cualquier otro marcador detectable evidente para los expertos en la técnica. Las etiquetas, macromoléculas que comprenden marcadores, y los métodos de su preparación útiles se describen en la solicitud de patente provisional U.S. 60/753.758, titulado "Nanoreporters and Methods of Manufacturing and Use Thereof", presentada el 23 de diciembre de 2005.

5 En ciertas realizaciones, un polinucleótido es un polímero de nucleobases naturales (por ejemplo, A, G, C, T, U) o sintéticas, o una combinación de ambos. El esqueleto del polinucleótido se puede componer enteramente de enlaces fosfodiéster "nativos", o puede contener uno o más enlaces modificados, tales como uno o más fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato u otros enlaces modificados. Como un ejemplo específico, un polinucleótido puede ser un ácido nucleico peptídico (PNA), que contiene interenlaces de amida. Los ejemplos adicionales de bases y esqueletos sintéticos que se pueden usar junto con la invención, así como métodos para su síntesis, se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente US nº 6.001.983; Uhlman & Peyman, 1990, *Chemical Review* 90(4):544 584; Goodchild, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1(3):165 186; Egholm *et al.*, 1992, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 1897; Gryaznov *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:3143 3144, así como las referencias citadas en todo lo anterior. Las nucleobases sintéticas comunes que componen estos polinucleótidos incluyen 3-metiluracilo, 5,6-dihidrouracilo, 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-torouracilo, 5-yodouracilo, 6-dimetilaminopurina, 6-metilaminopurina, 2-aminopurina, 2,6-diamino purina, 6-amino-8-bromopurina, inosina, 5-metilcitosina, 7-desazaadenina y 7-deazaguanosina. Los ejemplos adicionales no limitantes de nucleobases sintéticas que pueden componer el ácido nucleico diana se pueden hallar en Fasman, *CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 1985, pp. 385-392; *Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie*, Springer Verlag, Berlin and Chemical Abstracts, todos los cuales proporcionan referencias a publicaciones que describen las estructuras, propiedades y preparación de tales nucleobases.

El nanoindicador se puede preparar de acuerdo con cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica. Ventajosamente, los nanoindicadores de acuerdo con la invención pueden comprender etiquetas y/o miembros de pares de unión, como se describe en las secciones siguientes, que se pueden utilizar para facilitar la preparación y/o purificación del nanoindicador. Además, ciertos nanoindicadores de la invención son capaces de formar complejos con moléculas que comprenden miembros de pares de unión, como se describe a continuación. Estos complejos se pueden usar para facilitar la preparación y/o purificación del nanoindicador o complejo.

#### 5.13 Inmovilización de nanoindicadores extendidos

Una macromolécula se puede inmovilizar selectivamente mientras se extiende completamente bajo cualquier fuerza usada para la extensión. Además, los métodos de la invención facilitan la inmovilización selectiva de nanoindicadores extendidos que están orientados entre sí. En otras palabras, de acuerdo con los métodos de la invención, una pluralidad de nanoindicadores se puede inmovilizar fácilmente en la misma orientación con respecto al otro.

En la presente también se describen métodos para inmovilizar selectivamente un nanoindicador en un estado extendido. La macromolécula puede ser cualquier macromolécula conocida por los expertos en la técnica tal como un polímero, un polisacárido, un polinucleótido o un polipéptido. Para los métodos de este aspecto de la invención, generalmente, una primera porción del nanoindicador se inmoviliza mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. En efecto, la técnica para inmovilizar la primera porción del nanoindicador no es crítica para muchas realizaciones de la invención. En ciertas realizaciones, la primera porción del nanoindicador se puede inmovilizar de forma selectiva o no selectiva. En ciertas realizaciones, la primera porción se inmoviliza mediante uno o más enlaces covalentes. En ciertas realizaciones, la primera porción se inmoviliza mediante uno o más enlaces no covalentes.

Con una primera porción inmovilizada, el nanoindicador se puede extender por cualquier técnica para extender un nanoindicador evidente para los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la técnica para extender el nanoindicador no es crítica para los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, la técnica para extender el nanoindicador apropiada para la clase de nanoindicador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoindicador se extiende mediante la aplicación de una fuerza capaz de extender el nanoindicador. La fuerza puede ser cualquier fuerza evidente para un experto en la técnica para extender el nanoindicador. Los ejemplos de fuerzas incluyen gravedad, fuerza hidrodinámica, fuerza electromagnética y combinaciones de estas. Las técnicas específicas para extender el nanoindicador se describen en las secciones siguientes.

El nanoindicador está en un estado extendido si se puede reconocer como extendido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoindicador está en un estado extendido cuando está en el campo de una fuerza capaz de extender el nanoindicador. En ciertas realizaciones, el nanoindicador está en un estado extendido cuando su radio hidrodinámico promedio es más del doble del radio hidrodinámico promedio del nanoindicador en su estado nativo como reconocido por los expertos en la técnica.

En este aspecto, los métodos comprenden generalmente la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda parte del nanoindicador mientras está en un estado extendido. Esto puede producir un nanoindicador inmovilizado que se extiende entre la primera y la segunda porción. Notablemente, debido a que el nanoindicador se inmoviliza selectivamente mientras se extiende, esa extensión se puede conservar en el nanoindicador inmovilizado. Generalmente, la primera porción y la segunda parte del nanoindicador no son iguales.

La inmovilización selectiva puede ser de acuerdo con cualquier técnica para la inmovilización selectiva de una porción de un nanoindicador evidente para los expertos en la técnica. La inmovilización selectiva puede ser a través, por ejemplo, la formación de uno o más enlaces covalentes o uno o más enlaces no covalentes, o ambos. Los ejemplos particulares de las técnicas de inmovilización selectiva se describen en las siguientes secciones. En realizaciones particulares, se usan uno o más pares de unión para inmovilizar la segunda porción del nanoindicador.

La segunda porción se puede inmovilizar sobre cualquier sustrato evidente para los expertos en la técnica. El sustrato puede ser cualquier sustrato que se juzgue útil para la inmovilización conocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la segunda porción se puede inmovilizar a otra molécula. Otros sustratos útiles incluyen superficies, membranas, perlas, materiales porosos, electrodos, matrices y cualquier otro sustrato evidente para los expertos en la técnica.

En otro aspecto, se describen composiciones que comprenden un nanoindicador extendido selectivamente inmovilizado. Las composiciones comprenden generalmente un sustrato y un nanoindicador extendido inmovilizado selectivamente sobre el sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos de sustratos incluyen los descritos en las secciones siguientes. Al menos dos porciones del nanoindicador se inmovilizan sobre el sustrato, y el nanoindicador está en un estado extendido entre las dos porciones. En ciertas realizaciones, al menos una porción del nanoindicador se inmoviliza selectivamente sobre el sustrato. En ciertas realizaciones, dos o más porciones del nanoindicador se inmovilizan selectivamente sobre el sustrato. El nanoindicador se puede extender y/o inmovilizar mediante cualquier técnica evidente para los expertos, que incluyen particularmente los métodos de la presente invención.

En otro aspecto, en la presente se describen métodos para inmovilizar selectivamente un nanoindicador en un estado orientado. El nanoindicador puede ser cualquier nanoindicador descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, el nanoindicador puede ser flexible, o en ciertas realizaciones el nanoindicador puede ser rígido o semirrígido. Para los métodos de este aspecto de la invención, generalmente, una primera porción del nanoindicador se inmoviliza como se ha descrito anteriormente.

Con una primera porción inmovilizada, el nanoindicador se puede orientar por cualquier técnica para extender un nanoindicador evidente para los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la técnica para orientar el nanoindicador no es crítica para los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, la técnica para orientar el nanoindicador apropiado para la clase de nanoindicador de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoindicador está orientado por aplicación de una fuerza capaz de orientar el nanoindicador. La fuerza puede ser cualquier fuerza evidente para un experto en la técnica para orientar el nanoindicador. Los ejemplos de fuerzas incluyen gravedad, fuerza hidrodinámica, fuerza electromagnética y combinaciones de estas.

El nanoindicador está en un estado orientado si puede ser reconocido como orientado por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoindicador está en un estado orientado cuando está en el campo de una fuerza capaz de orientar el nanoindicador. En ciertas realizaciones, el nanoindicador está en un estado orientado cuando sus extremos terminales se disponen en paralelo, como es reconocido por los expertos en la técnica, con el campo de una fuerza capaz de orientar el nanoindicador. En ciertas realizaciones, una pluralidad de nanoindicadores está en un estado orientado cuando los extremos terminales de los nanoindicadores se disponen en paralelo, como es reconocido por los expertos en la técnica.

En este aspecto los métodos comprenden generalmente la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción del nanoindicador mientras está en un estado orientado. Esto puede producir un nanoindicador inmovilizado que está orientado entre la primera y la segunda porción. Notablemente, debido a que el nanoindicador se inmoviliza selectivamente mientras se extiende, esa orientación se puede conservar en el nanoindicador inmovilizado. La inmovilización selectiva puede ser de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

En otro aspecto, en la presente se describen composiciones que comprenden un nanoindicador orientado inmovilizado selectivamente. Las composiciones generalmente comprenden un sustrato y un nanoindicador orientado inmovilizado selectivamente sobre el sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos de sustratos incluyen los descritos en las secciones siguientes. Al menos dos porciones del nanoindicador se inmovilizan sobre el sustrato, y el nanoindicador está en un estado orientado entre las dos porciones. En ciertas realizaciones, al menos una porción del nanoindicador se inmoviliza selectivamente sobre el sustrato. En ciertas realizaciones, ambas porciones del nanoindicador se inmovilizan selectivamente sobre el sustrato. El nanoindicador se puede orientar y/o inmovilizar por cualquier técnica evidente para los expertos que incluyen particularmente los métodos de la presente invención.

Los métodos y composiciones descritos en la presente se pueden para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el nanoindicador inmovilizado y extendido y/u orientado se puede usar como una etiqueta para un sustrato sobre el cual el nanoindicador está inmovilizado. La secuencia primaria del nanoindicador inmovilizado y extendido y/u orientado se puede identificar por cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica. Ventajosamente, la inmovilización del nanoindicador extendido y/u orientado puede facilitar dichas técnicas. En ciertas realizaciones, el nanoindicador inmovilizado y extendido y/u orientado se puede usar para guiar la fabricación de nanovías, por ejemplo para crear nanocables o nanocircuitos. Otros usos para los nanoindicadores

inmovilizados y/o extendidos y/u orientados se describen en las secciones siguientes.

### 5.13.1 Métodos de inmovilización selectiva

5 Como se describió anteriormente, en la presente se describen métodos para la inmovilización selectiva de un nanoindicador en un estado extendido. El nanoindicador, una vez inmovilizado selectivamente, se puede usar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica.

### 5.13.2 Inmovilización de la primera porción

10 En los métodos descritos en la presente, se inmoviliza una primera porción del nanoindicador. En general, la primera porción se inmoviliza si se puede reconocer como inmovilizado por los expertos en la técnica. La primera porción se puede inmovilizar por cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la técnica para inmovilización de la primera porción del nanoindicador no es crítico para los métodos de la invención.

15 La primera porción del nanoindicador puede estar en cualquier lugar del nanoindicador. En ciertas realizaciones, la primera porción está en un extremo terminal del nanoindicador. Para los propósitos de la invención, una porción de un nanoindicador puede estar "en un extremo terminal" cuando es menor de cinco, cuatro, tres, dos, uno o cero monómeros de un extremo terminal del nanoindicador. Obviamente, aunque muchos nanoindicadores tienen dos extremos terminales, los métodos de la invención son aplicables a nanoindicadores que tienen más de dos extremos terminales y a nanoindicadores que tienen uno o cero extremos terminales, por ejemplo, nanoindicadores circulares. En ciertas realizaciones, la primera porción no está en un extremo terminal del nanoindicador.

20 El nanoindicador se puede inmovilizar sobre cualquier sustrato evidente para los expertos en la técnica. El sustrato puede ser cualquier resto con el cual el nanoindicador se pueda inmovilizar sin limitación. En ciertas realizaciones, el sustrato es una superficie, membrana, perla, material poroso, electrodo o matriz.

25 En ciertas realizaciones, la primera porción del nanoindicador se puede inmovilizar no selectivamente. En realizaciones adicionales, la primera porción del nanoindicador se puede inmovilizar selectivamente. En realizaciones ventajosas, después de que la primera porción del nanoindicador se inmoviliza, alguna porción del nanoindicador debe estar libre para moverse suficientemente de modo que el nanoindicador se puede extender y/u orientar en las siguientes etapas del método. En particular, en ciertas realizaciones, cuando la primera porción del nanoindicador se inmoviliza no selectivamente, es importante que el nanoindicador entero no sea inmovilizado no selectivamente en una medida que impida la extensión de cualquier porción del nanoindicador.

30 La inmovilización puede ser cualquier interacción con el sustrato evidente para los expertos en la técnica. La inmovilización puede ser por medio de interacción electrostática o iónica, por medio de más enlaces covalentes, por medio de uno o más enlaces no covalentes o sus combinaciones. En ciertas realizaciones, la inmovilización puede ser por medio de interacción electrostática con un electrodo. En realizaciones adicionales, la inmovilización es por medio de interacción electrostática con un sustrato diferente del electrodo.

35 En ciertas realizaciones, la primera porción del nanoindicador comprende un primer miembro de un par de unión. El primer miembro del par de unión se puede unir de modo covalente a la primera porción del nanoindicador, o se pueden unir de modo no covalente. Los enlaces covalentes y enlaces no covalentes útiles serán evidentes para los expertos en la técnica. En realizaciones útiles, el sustrato al que se une la primera porción del nanoindicador comprenderá un segundo miembro del par de unión. El sustrato se puede unir de modo covalente al segundo miembro, o se pueden unir de modo no covalente. La Figura 12 ilustra un nanoindicador que comprende un resto FI que es capaz de unirse selectivamente a un resto del sustrato. El resto FI puede ser, por ejemplo, biotina, capaz de unirse, por ejemplo, un sustrato recubierto con avidina.

45 En ciertas realizaciones, la primera porción del nanoindicador puede comprender un miembro de un par de unión que es capaz de unirse con un miembro de un par de unión sobre el sustrato para formar uno o más enlaces no covalentes. Los ejemplos de sustratos útiles incluyen los que comprenden un resto de unión seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas y anticuerpos. La primera porción del nanoindicador puede comprender un resto de unión capaz de unirse con el resto de unión del sustrato. Los ejemplos de sustratos útiles que comprenden restos reactivos incluyen, pero sin limitación, superficies que comprenden epoxi, aldehído, oro, hidrazida, sulfhidrilo, NHS-éster, amina, tiol, carboxilato, maleimida, hidroximetilfosfina, imidoéster, isocianato, hidroxilo, pentafluorofeniléster, psoraleno, disulfuro de piridilo o vinilsulfona, o mezclas de estos. Tales superficies pueden obtener a partir de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con técnicas estándar.

50 En realizaciones ventajosas, la primera porción del nanoindicador se puede inmovilizar al sustrato por medio de un par de unión de avidina-biotina. En ciertas realizaciones, el nanoindicador puede comprender un resto de biotina en su primera porción. Por ejemplo, un polinucleótido nanoindicador puede comprender un residuo de nucleótido biotinilado. De modo similar, un polipéptido nanoindicador puede comprender un residuo de aminoácido biotinilado. El sustrato que comprende avidina puede ser cualquier sustrato que comprende avidina conocida por los expertos en la técnica. Los sustratos útiles que comprenden avidina que están disponibles en el comercio incluyen TB0200 (Accelr8), SAD6, SAD20, SAD 100, SAD500, SAD2000 (Xantec), SuperAvidin (Matriz-It), portaobjeto con estreptavidina (catálogo #MPC 000, Xenopore) and STREPTAVIDINslide (catálogo #439003, Greiner Bio-one).

En ciertas realizaciones, la primera porción del nanoindicador puede comprender una secuencia de nucleótidos que es capaz de unirse selectivamente a una secuencia de nucleótidos sobre el sustrato. En realizaciones adicionales, la primera porción del nanoindicador puede comprender avidina, y el sustrato puede comprender biotina. Los sustratos útiles que comprenden biotina que están disponibles en el comercio incluyen pero sin limitación, Optiarray-biotina (Accler8), BD6, BD20, BD100, BD500 y BD2000 (Xantec).

En realizaciones adicionales, la primera porción del nanoindicador es capaz de formar un complejo con una o más moléculas diferentes que, a su vez, son capaces de unirse de modo covalente o no covalente, un resto de unión del sustrato. Por ejemplo, una primera porción del nanoindicador puede ser capaz de unirse selectivamente a otra molécula que comprende, por ejemplo, un resto de biotina que es capaz de unirse selectivamente, por ejemplo, a un resto de avidina del sustrato. La Figura 13A ilustra un nanoindicador que es capaz de unirse selectivamente a una segunda molécula X que es capaz de unirse selectivamente a una tercera molécula que comprende F1. F1 es capaz de unirse selectivamente a un resto sobre un sustrato. La Figura 13B ilustra un nanoindicador que es capaz de unirse selectivamente a una segunda molécula que comprende F1, y F1 es capaz de unirse selectivamente a un resto sobre un sustrato.

En realizaciones adicionales, la primera porción del nanoindicador puede comprender un miembro de a par de unión que es capaz de reaccionar con un miembro de un par de unión sobre el sustituto para formar uno o más enlaces covalentes. Los sustratos útiles que comprenden grupos reactivos incluyen aquellos que comprenden un resto reactivo seleccionado del grupo que consiste en succinamidas, aminas, aldehídos, epoxis y tioles. Los ejemplos de sustratos útiles que comprenden restos reactivos incluyen, pero sin limitación, superficies que comprenden epoxi, aldehído, oro, hidrazida, sulfhidrilo, NHS-éster, amina, tiol, carboxilato, maleimida, hidroximetilfosfina, imidoéster, isocianato, hidroxilo, pentafluorofeniléster, psoraleno, disulfuro de piridilo o vinilsulfona, o mezclas de estos. Tales superficies se pueden obtener a partir de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con técnicas estándar. La primera porción del nanoindicador puede comprender un resto reactivo capaz de reaccionar con el resto reactivo del sustrato. Los ejemplos de sustratos útiles que comprenden restos reactivos incluyen, pero sin limitación, grupo OptArray-DNA NHS (Accler8), Nexterion Slide AL (Schott) y Nexterion Slide E (Schott).

En ciertas realizaciones, la primera porción del nanoindicador puede comprender un resto reactivo que es capaz de unirse al sustrato por fotoactivación. El sustrato puede comprender el resto fotorreactivo, o la primera porción del nanoindicador puede comprender el resto fotorreactivo. Algunos ejemplos de restos fotorreactivos incluye aril azidas, tales como *N*-((2-piridilditio)etil)-4-azidosalicilamida; aril azidas fluoradas, tales como ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico; reactivos a base de benzofenona, tales como el succinimidil éster de ácido 4-benzoilbenzoico; y 5-Bromo-desoxiuridina.

En realizaciones adicionales, la primera porción del nanoindicador se puede inmovilizar al sustrato por medio de otros pares de unión evidente para los expertos en la técnica.

### 5.13.3 Extensión del nanoindicador

En ciertos métodos descritos en la presente, el nanoindicador está en un estado extendido. En general, cualquier nanoindicador está en un estado extendido si esto puede ser reconocido como tal por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, el nanoindicador está en un estado extendido cuando está en el campo de una fuerza capaz de extender el nanoindicador bajo condiciones adecuadas para extender el nanoindicador. Tales fuerzas y condiciones deben ser evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, muchos nanoindicadores se pueden extender por fuerza hidrodinámica o por gravedad, y muchos nanoindicador cargados se pueden extender por fuerza electromagnética. En ciertas realizaciones, la fuerza se puede aplicar al nanoindicador indirectamente. Por ejemplo, el nanoindicador puede comprender o se puede ligar, de modo covalente o no covalente, a un resto capaz de moverse por una fuerza. En ciertas realizaciones, el nanoindicador se puede ligar a un resto capaz de moverse por fuerza electromagnética, hidrodinámica u óptica.

En ciertas realizaciones, la fuerza es una fuerza electromagnética. Por ejemplo, cuando el nanoindicador es cargado, tal como un polinucleótido, el nanoindicador se puede extender en un campo eléctrico o magnético. El campo debe ser suficientemente fuerte para extender el nanoindicador de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. Los ejemplos de técnica para extender un nanoindicador en un campo eléctrico o magnético se describe en Matsuura *et al.*, 2002, *J Biomol Struct Dyn.* 20(3):429-36; Ferree & Blanch, 2003, *Biophys J.* 85(4):2539-46; Stigter & Bustamante, 1998, *Biophys J.* 1998 75(3): 1197-210; Matsuura *et al.*, 2001, *Nucleic Acids Res.*29(16); Ferree & Blanch, 2004, *Biophys J.* 87(1):468-75.

En ciertas realizaciones, la fuerza es una fuerza hidrodinámica. Por ejemplo, muchos nanoindicadores, que incluyen polisacáridos, polipéptidos, y polinucleótidos, se pueden extender en el campo de un fluido móvil. La fuerza hidrodinámica debe ser suficientemente fuerte para extender el nanoindicador de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. Los ejemplos de técnicas para extender un nanoindicador en el campo hidrodinámico se describen en Bensimon *et al.*, 1994, *Science* 265:2096-2098; Henegariu *et al.*, 2001, *BioTechniques* 31: 246-250; Kraus *et al.*, 1997, *Human Genetics* 99:374 - 380; Michalet *et al.*, 1997, *Science* 277:1518-1523; Yokota *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25(5): 1064-70; Otake *et al.*, 2001, *Nucleic Acids Research* 29:109; Zimmerman & Cox, 1994,

*Nucleic Acids Res.* 22(3):492-7, y las patentes U. S. Nros 6.548.255, 6.344.319, 6.303.296, 6.265.153, 6.225.055, 6.054.327, 5.840.862.

5 En ciertas realizaciones, la fuerza es gravedad. En realizaciones ventajosas, la fuerza de gravedad se puede combinar con, por ejemplo, la fuerza hidrodinámica para extender el nanoindicador. En ciertas realizaciones, la fuerza debe ser suficientemente fuerte para extender el nanoindicador de acuerdo con el criterio de los expertos en la técnica. Los ejemplos de técnicas para extender un nanoindicador con gravedad se describen en Michalet *et al.*, 1997, *Science* 111: 1518-1523; Yokota *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25(5): 1064-70; Kraus *et al.*, 1997, *Human Genetics* 99:374 - 380.

10 En realizaciones particulares, la fuerza se aplica a través de un menisco móvil. Los expertos en la técnica reconocerán que un menisco en movimiento puede aplicar varias fuerzas a un nanoindicador que incluye fuerza hidrodinámica, tensión superficial y/o cualquier otra fuerza reconocida por los expertos en la técnica. El menisco se puede mover por cualquier técnica evidente para los expertos en la técnica, que incluyen la evaporación y gravedad. Los ejemplos de técnicas para extender un nanoindicador con un menisco en movimiento se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. Nros 6.548.255, 6.344.319, 6.303.296, 6.265.153, 6.225.055, 6.054.327, 5.840.862.

15 En realizaciones particulares, el nanoindicador se puede extender mediante una trampa o pinzas ópticas. Por ejemplo, el nanoindicador puede comprender o puede estar unido, covalente o no covalentemente, a una partícula capaz de ser atrapada o movida por una fuente apropiada de fuerza óptica. Las técnicas útiles para mover partículas con trampas ópticas o pinzas ópticas se describen en Ashkin *et al.*, 1986, *Optics Letters* 11:288-290; Ashkin *et al.*, 1987, *Science* 235:1517-1520; Ashkin *et al.*, *Nature* 330:769-771; Perkins *et al.*, 1994, *Science* 264:822-826; Simmons *et al.*, 1996, *Biophysical Journal* 70:1813-1822; Block *et al.*, 1990, *Nature* 348:348 - 352; and Grier, 2003, *Nature* 424: 810-816.

En ciertas realizaciones, el nanoindicador se puede extender por combinaciones de las fuerzas anteriores que evidentes para los expertos en la técnica. En los ejemplos siguientes, ciertos nanoindicadores se extienden por una combinación de un campo eléctrico y fuerza hidrodinámica.

25 El nanoindicador se extiende cuando se puede reconocer como extendido por los expertos en la técnica de acuerdo con los criterios estándares para la extensión de un nanoindicador. En ciertas realizaciones, el nanoindicador se extiende cuando se pierde la mayor parte de sus rasgos estructurales terciarios como es reconocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoindicador se extiende cuando se pierde la mayor parte de sus rasgos estructurales secundarios como es reconocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el nanoindicador se extiende cuando sus rasgos estructurales primarios son detectables en secuencia cuando se visualizan de acuerdo con técnicas estándar. Los ejemplos de las técnicas de imágenes se describen en los siguientes ejemplos.

35 En ciertas realizaciones, un estado extendido de un nanoindicador se puede reconocer mediante la comparación de su radio hidrodinámico con su radio hidrodinámico promedio cuando están libres en solución diluida. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un nanoindicador, o porción de este, se extiende cuando su radio hidrodinámico es más de aproximadamente el doble de su radio hidrodinámico promedio en solución diluida. Más cuantitativamente,  $R$  representa el radio hidrodinámico del nanoindicador, o porción de este, y  $\langle R \rangle$  representa el radio hidrodinámico promedio del nanoindicador, o porción de este, en solución diluida. El  $\langle R \rangle$  promedio se debe calcular de modo que  $R$  para el nanoindicador, o porción de este, cuando no unido en solución diluida es menor de  $2\langle R \rangle$  95% del tiempo. En ciertas realizaciones, un nanoindicador, o porción de este, está en un estado extendido cuando  $R$  es mayor de  $1,5\langle R \rangle$ , mayor de  $1,6\langle R \rangle$ , mayor de  $1,7\langle R \rangle$ , mayor de  $1,8\langle R \rangle$ , mayor de  $1,9\langle R \rangle$ , mayor de  $2,0\langle R \rangle$ , mayor de  $2,1\langle R \rangle$ , mayor de  $2,2\langle R \rangle$ , mayor de  $2,3\langle R \rangle$ , mayor de  $2,4\langle R \rangle$ , mayor de  $2,5\langle R \rangle$  o mayor de  $3,0\langle R \rangle$ . En realizaciones particulares, a nanoindicador, o porción de este, está en un estado extendido cuando  $R$  es mayor de  $2,0\langle R \rangle$ .

#### 5.13.4 Orientación del nanoindicador

45 En ciertos métodos de la invención, el nanoindicador está en un estado orientado. En general, cualquier nanoindicador está en un estado orientado si puede ser reconocido como tal por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, el nanoindicador está en un estado orientado cuando está en el campo de una fuerza capaz de orientar el nanoindicador en condiciones adecuadas para orientar el nanoindicador. Tales fuerzas y condiciones deben ser evidentes para los expertos en la técnica.

50 En ciertas realizaciones, la fuerza es una fuerza electromagnética. Por ejemplo, cuando el nanoindicador está cargado, tal como un polinucleótido, el nanoindicador se puede orientar en un campo eléctrico o magnético. El campo debe ser lo suficientemente fuerte como para orientar el nanoindicador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Se describen anteriormente los ejemplos de técnicas para orientar un nanoindicador en un campo eléctrico o magnético.

55 En ciertas realizaciones, la fuerza es una fuerza hidrodinámica. Por ejemplo, muchos nanoindicadores, que incluyen polisacáridos, polipéptidos, y polinucleótidos, se pueden orientar en el campo de un fluido móvil. La fuerza hidrodinámica debe ser lo suficientemente fuerte como para orientar el nanoindicador de acuerdo con el criterio de un

experto en la técnica. Los ejemplos de técnicas para orientar un nanoindicador en el campo hidrodinámico se describen anteriormente.

5 En ciertas realizaciones, la fuerza es gravedad. En realizaciones ventajosas, la fuerza de gravedad se puede combinar con, por ejemplo, fuerza hidrodinámica o tensión superficial para orientar el nanoindicador. En ciertas realizaciones, la fuerza debe ser lo suficientemente fuerte como para orientar el nanoindicador de acuerdo con el criterio de un experto en la técnica. Los ejemplos de técnicas para orientar a nanoindicador con gravedad se describieron anteriormente.

En ciertas realizaciones, la fuerza es una fuerza óptica. Por ejemplo, la macromolécula puede comprender o puede estar unida, de forma covalente o no covalente, a una partícula capaz de ser atrapado o movido por una fuente apropiada de fuerza óptica como se describió anteriormente.

10 En ciertas realizaciones, el nanoindicador se puede orientar mediante combinaciones de las fuerzas anteriores que son evidentes para los expertos en la técnica. En los ejemplos, a continuación, ciertos nanoindicadores se orientan mediante una combinación de un campo eléctrico y fuerza hidrodinámica.

15 El nanoindicador se orienta cuando se puede reconocer como orientado por los expertos en la técnica de acuerdo con los criterios estándares para la orientación de un nanoindicador. En ciertas realizaciones, el nanoindicador se orienta cuando se dispone en paralelo, como es reconocido por los expertos en la técnica, con el campo de una fuerza capaz de orientar el nanoindicador. En ciertas realizaciones, el nanoindicador se orienta cuando es uno de una pluralidad de nanoindicador que se dispone en paralelo, como es reconocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una pluralidad de nanoindicadores se puede orientar cuando el vector de un primer extremo terminal a un segundo extremo terminal de un nanoindicador es paralelo, como es reconocido por los expertos en la técnica, a los vectores entre los correspondientes extremos terminales de otros nanoindicadores en la pluralidad.

20

### 5.13.5 Inmovilización selectiva de la segunda porción del nanoindicador

25 Como se discutió anteriormente, en los métodos descritos en la presente, una segunda porción del nanoindicador se inmoviliza selectivamente. La segunda porción del nanoindicador puede ser cualquier porción del nanoindicador que no es idéntico a la primera porción del nanoindicador. En algunas realizaciones, la segunda porción del nanoindicador no se superpone a ninguna parte de la primera porción del nanoindicador.

Además, se describen métodos que comprenden la etapa única de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoindicador mientras que el nanoindicador está en un estado extendido u orientado y mientras se inmoviliza una primera porción del nanoindicador. Los ejemplos de métodos para la inmovilización de la primera porción del nanoindicador y para la extensión u orientación del nanoindicador se describen en detalle en las secciones anteriores.

30 Además, en la presente se describen métodos que comprenden la etapa de extender un nanoindicador, mientras que una primera porción del nanoindicador se inmoviliza, y la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoindicador mientras el nanoindicador está en un estado extendido. Los ejemplos de métodos para la inmovilización de la primera porción del nanoindicador y para la extensión del nanoindicador se describen en detalle en las secciones anteriores.

35 Además en la presente se describen métodos que comprenden la etapa de inmovilizar una primera porción de un nanoindicador, la etapa de extender el nanoindicador mientras que la primera porción se inmoviliza y la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoindicador mientras que el nanoindicador está en un estado extendido. Los ejemplos de métodos para la inmovilización de la primera porción del nanoindicador, y para la extensión del nanoindicador se describen en detalle anteriormente.

40 Además en la presente se describen métodos que comprenden la etapa de orientar un nanoindicador, mientras que una primera porción del nanoindicador se inmoviliza, y la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoindicador mientras que el nanoindicador está en un estado orientado. Los ejemplos de métodos para la inmovilización de la primera porción del nanoindicador, y para orientar el nanoindicador se describe en detalle en la sección anterior.

45 Además en la presente se describen métodos que comprenden la etapa de inmovilizar una primera porción de un nanoindicador, la etapa de orientar el nanoindicador mientras que la primera porción se inmoviliza y la etapa de inmovilizar selectivamente una segunda porción de un nanoindicador mientras que el nanoindicador está en un estado orientado. Los ejemplos de métodos para la inmovilización de la primera porción del nanoindicador, y para orientar el nanoindicador se describe en detalle anteriormente.

50 La inmovilización selectiva de la segunda porción del nanoindicador puede seguir cualquier técnica para la inmovilización selectiva de un nanoindicador evidente para los expertos en la técnica. De modo significativo, en realizaciones ventajosas la segunda porción del nanoindicador no se inmoviliza no selectivamente. La inmovilización selectiva puede permitir al nanoindicador para inmovilizar mientras que está en un estado completamente extendido o estado casi completamente extendido. La inmovilización selectiva también puede permitir que el nanoindicador sea inmovilizado de una manera orientada. En otras palabras, la primera porción y la segunda porción del nanoindicador se puede inmovilizar a lo largo de la dirección del campo o campos usados para extender el nanoindicador, con la primera

55

porción que precede la segunda porción en el campo. Cuando se inmoviliza una pluralidad de nanoindicadores, estas se pueden orientar de modo uniforme a lo largo del campo.

La segunda porción del nanoindicador puede estar en cualquier lugar en el nanoindicador. En ciertas realizaciones, la segunda porción está en un extremo terminal del nanoindicador. En ciertas realizaciones, la segunda porción no está en un extremo terminal del nanoindicador. En ciertas realizaciones, la primera porción, descrita en las secciones anteriores, está en un extremo terminal del nanoindicador, y la segunda porción está en otro extremo terminal del nanoindicador.

Como se discutió anteriormente, la segunda porción del nanoindicador se inmoviliza selectivamente. La inmovilización puede ser por cualquier interacción selectiva con el sustrato evidente para los expertos en la técnica. La inmovilización puede ser por medio de interacción electrostática o iónica, por medio de uno o más enlaces covalentes, por medio de uno o más enlaces no covalentes o combinaciones de estos. En ciertas realizaciones, la inmovilización puede ser por medio de interacción electrostática con un electrodo. En realizaciones adicionales, la inmovilización es por medio de interacción electrostática con un sustrato diferente del electrodo.

Si la primera porción y la segunda porción del nanoindicador se inmovilizan selectivamente en el mismo sustrato, las técnicas de inmovilización selectiva deben ser, obviamente, compatibles con el sustrato. En realizaciones particulares, las técnicas de inmovilización son las mismas. Por ejemplo, sobre un sustrato recubierto con avidina, tanto la primera como la segunda porción del nanoindicador se pueden inmovilizar selectivamente a través de interacciones biotina - avidina. Sin embargo, como será evidente para los expertos en la técnica, no se necesita usar la misma interacción tanto en la primera como en la segunda porciones para inmovilización sobre el mismo sustrato. Por ejemplo, el sustrato puede comprender múltiples restos capaces de unión selectiva, o la primera porción se puede inmovilizar no selectivamente u otras técnicas evidentes para los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la segunda porción del nanoindicador comprende un primer miembro de un par de unión. El segundo miembro del par de unión se puede unir de modo covalente a la segunda porción del nanoindicador, o pueden estar unido de modo no covalente. Los enlaces covalentes y enlaces no covalentes útiles serán evidentes para los expertos en la técnica. En realizaciones útiles, el sustrato sobre el cual se une la segunda porción del nanoindicador comprenderá un segundo miembro del par de unión. El sustrato se puede unir de modo covalente al segundo miembro, o se pueden unir de modo no covalente.

En ciertas realizaciones, la segunda porción de nanoindicador puede comprender un miembro de un par de unión que es capaz de unirse con un miembro de un par de unión en el sustrato para formar uno o más enlaces no covalentes. Los ejemplos de sustratos útiles incluyen los que comprenden un resto de unión seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas y anticuerpos tales como los descritos en las secciones anteriores.

En realizaciones ventajosas, la segunda porción del nanoindicador se puede inmovilizar en el sustrato por medio de un par de unión avidina-biotina. En ciertas realizaciones, el nanoindicador puede comprender un resto de biotina en su primera porción. Por ejemplo, un nanoindicador de polinucleótido puede comprender un residuo de nucleótido biotinilado. De modo similar, un nanoindicador polipéptido puede comprender un residuo de aminoácido biotinilado. Los sustratos útiles que comprenden avidina se describen en las secciones anteriores.

En realizaciones adicionales, la segunda porción del nanoindicador puede comprender avidina, y el sustrato puede comprender biotina. Los sustratos útiles que comprenden biotina se describen en las secciones anteriores.

En realizaciones adicionales, la segunda porción del nanoindicador puede comprender un miembro de un par de unión que es capaz de reaccionar con un miembro de un par de unión en el sustrato para formar uno o más enlaces covalentes. Los ejemplos de sustratos útiles que comprenden grupos reactivos se describen en las secciones anteriores.

En ciertas realizaciones, la segunda porción del nanoindicador puede comprender un resto reactivo que es capaz de unirse al sustrato mediante la fotoactivación. El sustrato puede comprender el resto fotorreactivo, o la segunda porción del nanoindicador puede comprender el resto fotorreactivo. Algunos ejemplos de restos fotorreactivos incluye aril azidas, tales como 7V-((2-piridilditio)etil)-4-azidosalicilamida; aril azidas fluoradas, tales como ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico; reactivos a base benzofenona, tales como el succinimidil éster de ácido 4-benzoilbenzoico; y 5-bromo-desoxiuridina.

En realizaciones adicionales, la segunda porción del nanoindicador se puede inmovilizar al sustrato por medio de otros pares de unión descritos en las secciones anteriores.

En realizaciones adicionales, la segunda porción del nanoindicador es capaz de formar un complejo con una o más moléculas diferentes que, a su vez, son capaces de unirse, de modo covalente o no covalente, a un resto de unión del sustrato. Por ejemplo, la segunda porción del nanoindicador puede ser capaz de unirse selectivamente otra molécula que comprende, por ejemplo, un resto de biotina que es capaz de unirse selectivamente, por ejemplo, un resto de avidina del sustrato. La Figura 12B ilustra un método de unirse selectivamente una segunda molécula que comprende F3 que es, a su vez, capaz de unirse selectivamente a un resto sobre un sustrato. La interacción entre la segunda porción del

nanoindicador y la molécula que comprende F3 puede ser mediada, por ejemplo, por una interacción de antígeno-anticuerpo.

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

#### 5.13.6 Inmovilización de dos porciones de un nanoindicador extendido u orientado

La presente descripción proporciona métodos para la inmovilización selectiva de una primera porción y una segunda porción de un nanoindicador que está en un estado extendido U orientado. Significativamente, de acuerdo con estos métodos de la invención, el nanoindicador no necesita inmovilizarse antes de la aplicación de una fuerza capaz de extender U orientar el nanoindicador.

En estos métodos, el nanoindicador está extendido u orientado, o ambos, por una fuerza capaz de extender U orientar el nanoindicador. Tales fuerzas se describen en detalle en las secciones anteriores. En realizaciones particulares, la fuerza es una fuerza capaz de extender U orientar el nanoindicador mientras se mantiene el nanoindicador en un lugar, es decir, una fuerza capaz de extenderse u orientarse sin mover sustancialmente el nanoindicador. Los ejemplos de fuerzas incluyen campos electromagnéticos oscilantes y campos hidrodinámicos oscilantes. En una realización particular, la fuerza es un campo eléctrico oscilante. Los ejemplos de técnicas para extender u orientar un nanoindicador en un campo eléctrico oscilante se describen en Asbury *et al.*, 2002, *Electrophoresis* 23(16):2658-66; Kabata *et al.*, 1993, *Science* 262(5139):1561-3; and Asbury and van den Engh, 1998, *Biophys J.* 74:1024-30.

En los métodos, el nanoindicador se inmoviliza a una primera porción y en una segunda porción mientras que se extiende u orienta. Tanto la primera porción y la segunda porción se puede inmovilizar no selectivamente, se puede inmovilizar selectivamente, o uno se puede inmovilizar selectivamente y el otro no selectivamente. Las técnicas para la inmovilización de la primera porción y segunda porción se describen en detalle en las secciones anteriores.

#### 5.13.7 Sustrato para inmovilización

En los métodos descritos en la presente, el sustrato para inmovilización puede ser cualquier sustrato capaz de unirse selectivamente el nanoindicador evidente para los expertos en la técnica. Además, en ciertos aspectos, se describen composiciones que comprende un nanoindicador inmovilizado selectivamente en un estado extendido. Las composiciones comprenden un sustrato, descrito en la presente, que tienen inmovilizado a esto un nanoindicador en un estado extendido. El nanoindicador, obviamente, se puede inmovilizar de acuerdo con un método de la invención.

El único requerimiento del sustrato es que sea capaz de unirse selectivamente a la segunda porción del nanoindicador como se describió anteriormente. Por lo tanto, el sustrato puede ser un filtro o una membrana, tal como una nitrocelulosa o nylon, vidrio, un polímero tal como poliacrilamida, un gel tal como agarosa, dextrano, celulosa, poliestireno, látex o cualquier otro material conocido por los expertos en la técnica a la que se pueden inmovilizar compuestos de captura. El sustrato puede estar compuesto por un material poroso tal como acrílico, copolímero de metilmetacrilato de estireno y etileno/ácido acrílico.

El sustrato puede adoptar cualquier forma siempre que la forma no impida la inmovilización selectiva de la segunda porción del nanoindicador. Por ejemplo, el sustrato puede tener la forma de un disco, un bloque, una tira, un cordón, una partícula submicrónica, una perla magnética recubierta, una almohadilla de gel, un pocillo de microtitulación, portaobjeto, membrana, una frita u otra forma conocida por los expertos en la técnica. El sustrato está opcionalmente dispuesto dentro de una carcasa, tal como una columna de cromatografía, columna de giro, barril de jeringa, pipeta, punta de pipeta, placa de 96 ó 384 pocillos, microcanal, capilar, etc., que ayuda al flujo de líquido por o a través del sustrato.

El nanoindicador se puede inmovilizar sobre un sustrato único o en una pluralidad de sustratos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las primera y segunda porciones se inmovilizan en el mismo sustrato, como es reconocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la primera porción del nanoindicador se puede inmovilizar en un primer sustrato mientras que la segunda porción del nanoindicador se puede inmovilizar en un segundo sustrato, distinto del primero.

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

Los ejemplos de sustratos útiles incluyen superficies recubiertas con estreptavidina, por ejemplo, Accelr8 TB0200. Otros sustratos útiles incluyen superficies recubiertas con N-hidroxisuccinamida que son capaces de reaccionar con una porción de un nanoindicador que comprende una amina. Una de tales superficies es OptArray-DNA (AccelRS). Se recubren superficies útiles adicionales con aldehído (por ejemplo, Nexterion Slide AL, Schott) y superficies recubiertas con epoxi (por ejemplo, Nexterion Slide E, Schott). Otra superficie útil es una superficie recubierta con BSA biotinilada útil para la inmovilización selectiva de una porción de un nanoindicador que comprende avidina o estreptavidina.

#### 5.13.8 Métodos de uso de nanoindicador inmovilizado selectivamente, extendidos u orientados

Los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados son útiles para mapeo, nanoensamblaje y resonancia de plasmón superficial. En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para macromoléculas con una variedad de técnicas, *por ejemplo*, microscopia de fuerza atómica o microscopia electrónica.

En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para mapeo macromolecular. Por ejemplo, se pueden usar para determinar la ubicación de la unión o hibridación a lo largo de una macromolécula, por ejemplo, por moléculas fluorescentes o proteínas de unión de ADN.

En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para nanoensamblaje. Por ejemplo, se pueden usar para facilitar el crecimiento de cristales en nanoindicadores extendidos y/u orientados, o crecimiento de cristales sobre polipéptidos ligados o unidos a macromoléculas extendidas y/u orientadas. En ciertas realizaciones, las macromoléculas inmovilizadas selectivamente, extendidas y/u orientadas se pueden usar para la construcción de nanovías. En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para el transporte dirigido usando motores moleculares, tales como kinesina o miosina. En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para la computación molecular o para el ensamblaje de circuitos que comprenden macromoléculas, por ejemplo, computación de ADN. En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para manipular nanotubos de carbono.

En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para el estudio de proteínas de unión al polinucleótido. Se pueden usar, por ejemplo, para determinar la presencia o localización de proteína unida a un polinucleótido. Las técnicas útiles incluyen resonancia de plasmón superficial. En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar para el estudio de fibras de proteína, tales como amiloide, titina, y fibronectina.

En ciertas realizaciones, los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados selectivamente se pueden usar para crear códigos de barras macromoleculares con el propósito de separación y detección secuencial de etiquetas. Estas etiquetas espaciadas a lo largo de la molécula proporcionan un código único que se puede leer cuando el nanoindicador está inmovilizado y extendido y/u orientado. La extensión y/u orientación con inmovilización selectiva pueden facilitar la decodificación del código de barras macromolecular.

Los nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos y/u orientados se pueden usar adicionalmente para ser utilizados en cualquier contexto en el que la detección o formación de imágenes de un nanoindicador podría ser útil. Se pueden usar para fines de diagnóstico, pronóstico terapéutico y análisis. Por ejemplo, se aplican al análisis de muestras biomoleculares obtenidas o derivadas de un paciente con el fin de determinar si un tipo de célula enferma está presente en la muestra y/o para clasificar la enfermedad. Se pueden usar para diagnosticar infecciones patógenas, por ejemplo infecciones por bacterias intracelulares y virus, mediante la determinación de la presencia y/o cantidad de marcadores de bacteria o virus, respectivamente, en la muestra. Las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para cuantificar moléculas diana cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o condición de enfermedad, por ejemplo, marcadores sanguíneos que están regulados por aumento o regulación por disminución como resultado de un estado de enfermedad. Además, las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para proporcionar información pronóstica que ayude a determinar un curso de tratamiento para un paciente.

5.13.9 Kits que comprenden nanoindicadores inmovilizados selectivamente, extendidos u orientados

Además, en la presente se describen kits que comprenden uno o más componentes de la invención. Los kits pueden comprender, por ejemplo, un sustrato de acuerdo con la invención y uno o más nanoindicadores inmovilizados selectivamente extendidos y/u orientados, o ambos, inmovilizados selectivamente sobre el sustrato. Los kits se pueden usar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica, que incluyen los descritos anteriormente.

En ciertas variantes, en la presente se describen kits útiles para la extensión y/u orientación e inmovilización selectiva de nanoindicadores. Los kits pueden comprender un sustrato para inmovilización y uno o más compañeros de unión para facilitar la extensión y/u orientación o inmovilización de un nanoindicador. Los compañeros de unión, en ciertas realizaciones, pueden comprender un resto útil para la extensión y/u orientación del nanoindicador en una fuerza apropiada. En ciertas realizaciones, los compañeros de unión pueden facilitar la inmovilización o inmovilización selectiva del nanoindicador a la superficie. En realizaciones adicionales, el kit puede comprender un nanoindicador para la extensión y/u orientación e inmovilización. En realizaciones adicionales, el kit podría comprender un dispositivo capaz de extender el nanoindicador.

5.14 Detección de nanoindicadores

Los nanoindicadores se detectan por cualquier medio disponible en la técnica que sea capaz de detectar las señales específicas en un nanoindicador dado. Cuando el nanoindicador está marcado con fluorescencia, se puede investigarse la consideración adecuada de las fuentes de excitación apropiadas. Las fuentes positivas pueden incluir pero no se limitan a lámpara de arco, lámpara de xenón, láseres, diodos emisores de luz o alguna combinación de estas. La fuente de excitación apropiada se utiliza conjuntamente con un sistema de detección óptico apropiado, por ejemplo un microscopio fluorescente invertido, un microscopio epi-fluorescente o un microscopio confocal. Con preferencia, se utiliza un microscopio que puede permitir la detección con suficiente resolución espacial para determinar la secuencia de las manchas en el nanoindicador.

5.14.1 Selección del microscopio y lente del objetivo

La consideración principal con respecto a la lente del objetivo del microscopio es con la resolución óptica, que se determina por su apertura numérica (NA). Generalmente, mayor NA, mejor resolución óptica. La NA requerida es preferentemente al menos 1,07 basada en la relación de  $\delta = 5 = 0,61\lambda/NA$  ( $\delta$  = resolución óptica y  $\lambda$  = longitud de onda). La cantidad de luz que se recolecta en un objetivo está determinada por  $NA^4/Mag^3$  (Mag = aumento del objetivo). Por lo tanto, con el fin de recolectar la mayor cantidad de luz posible, se deben seleccionar objetivos con NA alta y aumentos bajos.

5.14.2 Selección de la cámara ccd y técnicas de captura de imágenes

Cuando se selecciona una cámara CCD, la primera consideración es el tamaño de píxel, que determina parcialmente la resolución final del sistema de formación de imágenes. De manera óptima la resolución óptica no debe estar comprometida por la cámara CCD. Por ejemplo, si la resolución óptica es 210-300 nm, que corresponde a 12,6-18 pm en un chip CCD después de un aumento de 60x, con el fin de resolver y mantener la resolución óptica debe haber al menos dos píxeles para muestrear cada punto. O el tamaño de píxel del chip CCD debe ser como máximo 6.3- 9  $\mu$ m.

La segunda consideración es la sensibilidad de detección que se puede determinar por muchos factores que incluyen pero sin limitación a tamaño de píxel, eficiencia cuántica, ruido de lectura y ruido oscuro. Para lograr una alta sensibilidad, se selecciona una cámara cualitativa con gran tamaño de píxel (que puede dar un área de recolección alta), alta eficiencia cuántica y bajo nivel de ruido. Un ejemplo de cámara con estos criterios es la cámara Orca-Ag de Hamamatsu Inc.

5.15 Sistema informático

La invención proporciona sistemas de ordenador que se pueden usar para automatizar la recolección de imágenes de nanoindicadores, realizar la identificación de nanoindicadores y/o decodificar los códigos de nanoindicadores. Específicamente, la invención proporciona varios sistemas de ordenador que ejecutan uno o más programas descritos a continuación (por ejemplo, módulo de almacenamiento de datos 44, módulo de identificación de etiqueta 50, módulo de identificación de sonda 54). Los sistemas de ordenador pueden controlar una cámara que toma imágenes de luz de nanoindicadores unidos a sustratos. Estas imágenes de luz luego son usados por los ordenadores de la presente invención para identificar y decodificar nanoindicadores.

La Figura 9 detalla un ejemplo del sistema que soporta la funcionalidad descrita en la presente. El sistema con preferencia es un sistema informático 10 que tiene:

- una unidad de procesamiento central 22;
- Una unidad de almacenamiento principal no volátil 14, por ejemplo, una unidad de disco duro para almacenar software y datos, la unidad de almacenamiento 14 controlada por el controlador 12;

•una memoria de sistema 36, con preferencia una memoria de acceso aleatorio de alta velocidad (RAM), para almacenar programas de control del sistema, datos y programas de aplicación, que comprende programas y datos cargados desde la unidad de almacenamiento no volátil 14; la memoria de sistema 36 también puede incluir memoria de sólo lectura (ROM);

5 •una interfaz de usuario 32, que comprende uno o más dispositivos de entrada (por ejemplo, teclado 28) y una pantalla 26 u otro dispositivo de salida;

•Una tarjeta de interfaz de red 20 u otro circuito de comunicación para conectar con el detector 72 y, opcionalmente, cualquier red de comunicación cableada o inalámbrica 34 (por ejemplo, Internet o cualquier otra red de área amplia);

•un bus interno 30 para interconectar los elementos mencionados anteriormente del sistema, y

10 • una fuente de energía 24 para alimentar los elementos antes mencionados.

La operación del sistema informático 10 es controlado principalmente por el sistema operativo 40, que es ejecutado por la unidad de procesamiento central 22. El sistema operativo 40 se puede almacenar en la memoria del sistema 36. Además del sistema operativo 40, en una implementación típica, la memoria del sistema 36 puede incluir Uno o más de los siguientes:

15 •sistema de archivos 42 para controlar el acceso a los diversos archivos y estructuras de datos utilizados por la presente invención;

• un módulo de almacenamiento de datos 44 que comprende instrucciones para almacenar una pluralidad de imágenes de luz 46;

20 •un módulo de identificación de etiquetas 50 para identificar una pluralidad de etiquetas 52 en la pluralidad de imágenes de luz que están próximas entre sí sobre un sustrato, donde un orden espacial de la pluralidad de etiquetas determina una secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas;

•un módulo de identificación de sonda 54 para determinar si la secuencia de cadenas de una pluralidad de etiquetas comprende una secuencia indicadora válida; y

• una tabla de consulta 56 que incluye una pluralidad de secuencias indicadoras válidas 58.

25 Como se ilustra en la Fig. 9, el sistema informático 10 comprende módulos de programa de software y estructuras de datos. Las estructuras de datos almacenados en el sistema informático 10 incluyen, por ejemplo, imágenes 46, etiquetas 52 y tabla de consulta 56. Cada una de estas estructuras de datos puede comprender cualquier forma de almacenamiento de datos que incluyen, pero sin limitación, un archivo ASCII plano o binario, una hoja de cálculo Excel, una base de datos relacional (SQL), una base de datos de procesamiento analítico en línea (OLAP) (MDX y/o variantes de estos) o un archivo de valores separados por comas. En algunas realizaciones, las estructuras de datos y los  
30 módulos de software representados en la Figura 9 no están alojados en el sistema informático 10, sino que están alojados en un ordenador u otro tipo de dispositivo de almacenamiento que está en comunicación eléctrica con el sistema informático 10 a través de la red 34.

35 Un aspecto de la presente invención proporciona un producto de programa de ordenador que comprende un medio de almacenamiento legible por ordenador (por ejemplo, memoria 36, unidad de almacenamiento 14, y/u otros medios de almacenamiento legibles por ordenador) y un mecanismo de programa de ordenador incorporado allí. El mecanismo del programa de ordenador es para detectar la presencia de una sonda dentro de una muestra superpuesta sobre un sustrato. Como se describió anteriormente, la sonda comprende una pluralidad de monómeros marcadores dispuestos espacialmente en una o más regiones de unión de etiqueta de un nanoindicador dado. La secuencia de señales  
40 emitidas por los monómeros marcadores asociados con las diversas regiones de unión de etiqueta del andamio de un nanoindicador dado permite la identificación única del nanoindicador. El mecanismo de programa de ordenador comprende un módulo de almacenamiento de datos 44, un módulo de identificación de etiqueta 50 y un módulo de identificación de sonda 54.

45 *Medio de almacenamiento de datos 44.* El módulo de almacenamiento de datos 44 comprende instrucciones para almacenar una pluralidad de imágenes de luz 46. Cada imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz es de luz emitida de una muestra superpuesta sobre un sustrato. Las muestras biológicas representativas se describen en la Sección 5.10, anterior. Los sustratos representativos se describen en la Sección 5.13.7. En realizaciones típicas, cada imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz es un barrido, tomada por el detector 72, de una porción de un sustrato. Los ejemplos de detectores 72 se describen en la sección 5.14.2. Un ejemplo de detector 72 no limitante es la  
50 cámara Orca-Ag de Hamamatsu Inc. Cada imagen de luz es una imagen del sustrato sobre el que está superpuesta la muestra que contiene un nanoindicador tomada por el detector 72. Cada imagen de luz registra la luz de la muestra en un intervalo de longitudes de onda correspondiente en una pluralidad de rangos de longitudes de onda diferentes. En otras palabras, cada imagen de luz mide la luz en un intervalo de longitud de onda seleccionado. En algunas realizaciones, el intervalo de longitud de onda de una imagen de luz se determina por las especificaciones de un filtro de luz que filtras luz recibida por el detector 72. El filtro bloquea efectivamente la luz que no está dentro de un intervalo  
55

de longitud de onda especificado. En la práctica, se toma una pluralidad de imágenes de luz, y cada imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz se toma utilizando un filtro seleccionado de una pluralidad de filtros diferentes. En algunas realizaciones, se toman 2 o más imágenes de luz, 3 o más imágenes de luz, 4 o más imágenes de luz, 5 o más imágenes de luz, 6 o más imágenes de luz, 7 o más imágenes de luz, 8 o más imágenes de luz, 9 o más imágenes de luz, o 10 o más imágenes de luz, entre 2 y 20 imágenes de luz, entre 2 y 100 imágenes de luz, o menos de 30 imágenes de luz. Los filtros para limitar la luz en intervalos de longitud de onda predeterminados están disponibles en el comercio. Los ejemplos no limitantes de filtros disponibles en el comercio son HQ480/40, Q505LP, HQ535/50, HQ545/30x, 570LP, HQ587/30m, HQ630/20, Q649LP, y HQ655LP por Chroma Inc. Los ejemplos de intervalos de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda puede ser, por ejemplo, el intervalo de longitud de onda entre 485 nm y 585 nm, el intervalo de longitud de onda entre 557 nm y 617 nm, el intervalo de longitud de onda entre 637 nm y 697 nm, el intervalo de longitud de onda entre 510 nm y 650 nm, el intervalo de longitud de onda entre 586 nm y 658 nm, el intervalo de longitud de onda entre 515 nm y 575 nm, y el intervalo de longitud de onda entre 440 nm y 520 nm. Muchos otros intervalos de longitud de onda se pueden usar además de o en vez de alguno o todos los intervalos de longitud de onda mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, la pluralidad de intervalos de longitud de onda diferentes consiste en entre dos y seis intervalos de longitud de onda diferentes, entre dos y veinte intervalos de longitud de onda diferentes, más de diez intervalos de longitud de onda diferentes, más de veinte intervalos de longitud de onda diferentes, más de treinta intervalos de longitud de onda diferentes, más de cuarenta intervalos de longitud de onda diferentes, más de 100 intervalos de longitud de onda diferentes, o menos de cincuenta intervalos de longitud de onda diferentes. En algunas realizaciones cada intervalo de longitud de onda representa un color diferente. En algunas realizaciones existe algún grado de superposición entre intervalos de longitud de onda diferentes. En algunas realizaciones no existe superposición entre intervalos de longitud de onda diferentes.

Una ventaja de la presente invención es que no existe un requerimiento de que los nanoindicadores descritos en la presente se superpongan en una posición predeterminada sobre el sustrato como es el caso en las técnicas de micromatriz. Aunque se pueden preparar sustratos especializados de tal manera que los nanoindicadores de la presente invención se adherirán a posiciones predeterminadas sobre un sustrato, en realizaciones preferidas, la ubicación en la que una nanocadena se adhiere a un sustrato es totalmente aleatoria. Además, en realizaciones preferidas, todo lo que se necesita determinar es la identidad de un nanoindicador sobre el sustrato. Por lo tanto, las señales se miden a partir del sustrato con el fin de la identificación del nanoindicador. Como tal, las señales se procesan de una manera binaria (por ejemplo, ausencia o presencia de una longitud de onda dada) en realizaciones preferidas usando los módulos de software descritos a continuación. En algunas realizaciones, no solo la posición de nanoindicadores sobre el sustrato es aleatoria, también lo es la orientación. Incluso en casos donde la orientación del nanoindicador sobre el sustrato es aleatoria, los módulos de software descritos a continuación pueden identificar los nanoindicadores. Otra ventaja de la presente invención es que no existe el requerimiento de que múltiples regiones del sustrato estén unidas entre sí en una imagen de luz compuesta. Se toman múltiples imágenes de luz del sustrato, pero cada una de estas imágenes de luz procede de la misma región del sustrato, solo a diferentes longitudes de onda.

En algunas realizaciones, una etiqueta fluorecerá a múltiples longitudes de onda (por ejemplo, rojo y azul). En tales realizaciones, el módulo de identificación de etiqueta descrito a continuación detecta tal etiqueta mediante la medición de una mancha en la misma posición sobre el sustrato en múltiples imágenes de luz. Los criterios de intensidad se pueden utilizar en tales casos. Por ejemplo, se podría imponer un requerimiento que (i) se observe una intensidad azul mínima en una imagen de luz que almacene la luz azul emitida por la muestra y (ii) que se observe una intensidad mínima roja en la misma mancha en la imagen de luz que almacena la luz roja emitida por la muestra.

*Módulo de identificación de etiqueta 50.* El módulo de identificación de etiqueta 50 comprende instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas (monómeros marcadores), en la pluralidad de imágenes de Luz 46, que están próximas entre sí sobre el sustrato. En las realizaciones típicas, cada etiqueta en un nanoindicador emitirá luz que hace que aparezca una mancha luminosa correspondiente en una o más imágenes de luz 46. Cada imagen de luz 46 puede tener decenas, cientos o incluso miles de manchas, donde cada mancha representa potencialmente una etiqueta en un nanoindicador. El módulo de identificación de etiquetas 50 estima que estas manchas en las imágenes de luz son etiquetas cuando se satisfacen criterios específicos, descritos con detalle a continuación.

El módulo de identificación de etiqueta 50 es capaz de identificar etiquetas que están próximas entre sí sobre el sustrato incluso cuando estas etiquetas aparecen en diferentes imágenes de luz. Por ejemplo, se debe considerar el caso en que la etiqueta 1 (monómero de luz 1) y etiqueta 2 (monómero de luz 2) están en el mismo nanoindicador y están espacialmente próximos sobre el sustrato. Además se debe considerar que la etiqueta 1 y etiqueta 2 emiten luz dentro de los intervalos de longitud de onda diferentes. En consecuencia, en este ejemplo, la luz emitida por la etiqueta 1 y por la etiqueta 2 se registra en diferentes imágenes de luz, es decir Imagen de luz A e imagen de luz B, respectivamente. En algunas realizaciones, la emisión de luz de la etiqueta 1 se registra como una mancha de intensidad brillante en la imagen de luz A mientras que la emisión de luz de la etiqueta 2 se registra como una mancha de intensidad brillante en la imagen de luz B. En este ejemplo, el módulo de identificación de etiqueta 50 superpone la imagen de luz A y la imagen de luz B. La Imagen de luz A y la imagen de luz B cubren la misma región del sustrato. Esta región del sustrato puede abarcar varios nanoindicadores. En efecto, esta región del sustrato cubierta por la imagen de luz A y la imagen de luz B puede abarcar cientos o incluso miles de nanoindicadores. Por lo tanto, la imagen de luz A y la imagen de luz B pueden registrar potencialmente decenas, cientos o incluso miles de etiquetas, donde

5 cada etiqueta aparece, por ejemplo, como una mancha brillante en la imagen de luz A, la imagen de luz B o alguna otra imagen de luz que es tomada por el detector 72. La imagen de luz A y la imagen de luz B solo difieren en el intervalo de longitud de onda registrado. Debido a que la imagen de luz A y la imagen de luz B se superponen espacialmente entre sí, el módulo de identificación de etiqueta 50 puede identificar la proximidad espacial de la etiqueta 1 y la etiqueta 2, aunque la etiqueta 1 y la etiqueta 2 se originan en diferentes imágenes de luz sobre la base de la proximidad espacial de la etiqueta 1 y la etiqueta 2 en las imágenes de luz superpuestas.

10 Cada intervalo de longitud de onda representada por una imagen de luz 46 está destinado a medir un color particular emitido por uno o más monómeros marcadores en una nanocadena. En algunas realizaciones, un intervalo de longitud de onda abarca un conjunto contiguo de longitudes de onda que tiene un ancho espectral de hasta 10 nm, hasta 20 nm, hasta 30 nm, hasta 40 nm, hasta 50 nm, hasta 60 nm, hasta 70 nm, hasta 80 nm, hasta 90 nm, o hasta 100 nm.

15 En algunas realizaciones, el módulo de identificación de etiqueta 50 alinea las imágenes de luz usando referencias. Un ejemplo no limitante de una referencia es una perla de látex que está impregnada con muchos tipos diferentes de colorante. Un ejemplo de una referencia es el kit de microscopía de fluorescencia multiespectral MultiSpeck™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon). El kit de estándares de microscopía de fluorescencia multiespectral MultiSpeck™ se comercializa como una referencia externa para comparar imágenes recolectadas con diferentes ópticas, en diferentes instrumentos y en diferentes laboratorios, así como para controlar las variaciones día a día de rutina en el desempeño instrumental. El kit incluye dos suspensiones de microesferas de diámetro submicrónico. La primera suspensión, la suspensión MultiSpeck, está compuesta de microesferas fluorescentes multiespectrales que exhiben tres bandas de excitación y emisión relativamente distintas, rojo, verde y azul, todas en la misma partícula. Cuando se excita con luz ultravioleta, cada esfera emite fluorescencia azul, mientras que cuando se usan filtros de fluoresceína o de rodamina/Texas Red®, las esferas fluorescen a longitudes de onda similares a las emisiones de fluoresceína o rodamina/rojo de Texas, respectivamente. Además, debido a que una microesfera multiespectral única aparecerá de diferentes colores de acuerdo con los filtros utilizados para la observación, estas microesferas se pueden usar para el registro de imágenes a través de múltiples longitudes de onda, de este modo se permite la determinación precisa de las relaciones espaciales de múltiples etiquetas en un experimento multiparamétrico. La segunda suspensión, la suspensión de mezcla RGB, está compuesta por una mezcla de microesferas de "banda única" que exhiben las mismas tres bandas de excitación/emisión, rojo, verde y azul, (RGB) que las microesferas multiespectrales, pero en partículas separadas. En consecuencia, una referencia emitirá luz a través de varias longitudes de onda diferentes. Las referencias se disponen aleatoriamente sobre el sustrato junto con la muestra. Debido a que las referencias emiten luz a través de un intervalo amplio de frecuencias espectrales, están presentes en varias, si no en toda la pluralidad de imágenes de luz. De este modo, el módulo de identificación de etiqueta 0 puede alinear la mayoría si no todas las imágenes de luz en una pluralidad de imágenes entre sí utilizando las manchas de referencia presentes en las imágenes de luz, con la condición de que las imágenes de luz pertenezcan a la misma región del sustrato (*por ejemplo*, el mismo campo de vista).

35 Un orden espacial de la pluralidad de etiquetas determina una secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas. Por ejemplo, se debe considerar el caso en el que la siguiente cadena de monómeros marcadores se detectan en el sustrato: rojo - rojo - verde - azul. El orden espacial de estos monómeros marcadores en el sustrato rige la secuencia de cadenas de una posible sonda. Por lo tanto, si se detectan monómeros marcadores dispuestos en serie sobre el sustrato con la disposición en serie: rojo - rojo - verde - azul, los monómeros marcadores dispuestos en serie forman la secuencia de cadena: RRGB, donde R significa rojo, G significa verde y B significa azul. La secuencia de cadenas RRGB es potencialmente una secuencia de cadenas de una sonda válida.

45 La presente invención abarca un intervalo amplio de etiquetas diferentes que se pueden usar en una sonda. En algunas realizaciones, cada etiqueta en una pluralidad de etiquetas dispuestas espacialmente puede emitir luz en uno de cuatro intervalos de longitud de onda diferentes: a red intervalo de longitud de onda, un intervalo de longitud de onda verde, un intervalo de longitud de onda azul, o blanco (sin emisión). En algunas realizaciones, cada etiqueta en una pluralidad de etiquetas dispuestas espacialmente puede emitir luz en uno de cinco intervalos de longitud de onda diferentes, seis intervalos de longitud de onda diferentes, siete intervalos de longitud de onda diferentes, ocho intervalos de longitud de onda diferentes, nueve intervalos de longitud de onda diferentes, diez intervalos de longitud de onda diferentes, entre cinco y quince intervalos de longitud de onda diferentes, entre cuatro y veinte intervalos de longitud de onda diferentes, entre tres y cuarenta intervalos de longitud de onda diferentes, más de 30 intervalos de longitud de onda diferentes, o menos de 100 intervalos de longitud de onda diferentes. Además, la presente invención no impone ninguna limitación en el número de etiquetas (monómeros marcadores) que están presentes en una sonda dada. En algunas realizaciones, existen entre dos y 100 etiquetas en una sonda, entre dos y 1000 etiquetas en una sonda, entre dos y 20 etiquetas en una sonda, entre tres y 40 etiquetas en una sonda, más de cinco etiquetas en una sonda, más de seis etiquetas en una sonda, más de siete etiquetas en una sonda, más de diez etiquetas en una sonda, o menos de cincuenta etiquetas en una sonda.

60 El módulo de identificación de etiqueta 50 determina el orden espacial de las etiquetas sobre un sustrato. Para lograr esto, se identifica una pluralidad de etiquetas en las imágenes. En realizaciones típicas, hay más de una sonda en la porción del sustrato que se visualiza, y cada una de dichas sondas tiene una pluralidad de etiquetas espacialmente dispuestas que generan manchas correspondientes en las imágenes de luz. En algunas realizaciones, hay entre dos y 10.000 sondas en la porción del sustrato que está formando una imagen. Por lo tanto, el módulo de identificación de etiquetas 50 tiene que determinar qué manchas en las imágenes son etiquetas así como identificar conjuntos de

etiquetas que pertenecen cada una a una sonda única. Esta tarea se hace más compleja en las realizaciones preferidas en las que las sondas se unen aleatoriamente al sustrato.

En algunas realizaciones, el módulo de identificación de etiqueta 50 primero valida etiquetas en las imágenes de luz. Luego, el módulo de identificación de etiqueta 50 procede a determinar cuál de las etiquetas en la pluralidad de etiquetas pertenece a la misma sonda usando una o más reglas. En algunas realizaciones módulo de identificación de etiqueta 50 primero identifica una pluralidad de etiquetas candidatas que da origen a las manchas en la pluralidad de imágenes de luz. Cada etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas candidatas comprende una posición en el sustrato que emite más de una cantidad umbral de luz en una o más imágenes de luz en la pluralidad de imágenes de luz. En algunas realizaciones, la pluralidad de etiquetas comprende una primera etiqueta candidata que emite luz en una primera longitud de onda en la pluralidad de diferentes longitudes de onda y una segunda etiqueta candidata en la pluralidad de etiquetas que emite luz en una segunda longitud de onda en la pluralidad de diferentes longitudes de onda. En algunas realizaciones, se estima que una etiqueta candidata es una etiqueta válida cuando emite más de una cantidad umbral de luz en cualquier imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz. En algunas realizaciones, el módulo de identificación de etiqueta 50 verifica que una etiqueta candidata es una etiqueta válida cuando la etiqueta cumple el criterio de forma de la mancha (*por ejemplo*, una coincidencia entre una forma de mancha observada de la etiqueta candidata y la dispersión del punto teórico de la luz de fuente puntual limitada de difracción determinada por un aumento de la etiqueta candidata). En algunas realizaciones, el módulo de identificación de etiqueta 50 verifica que una etiqueta candidata es una etiqueta válida usando modelado de función de dispersión de puntos. En algunas realizaciones, el módulo de identificación de etiquetas 50 valida una etiqueta candidata usando un algoritmo de segmentación de la mancha (*por ejemplo*, una transformación divisoria). Las transformaciones divisorias se describen en Vincent y Soille, 1991, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 13, pp. 583-598,

En algunas realizaciones, módulo de identificación de etiqueta 50 verifica que una etiqueta candidata es una etiqueta válida cuando la etiqueta cumple el criterio de forma de la mancha (*por ejemplo*, una coincidencia entre una forma de mancha observada de la etiqueta y la dispersión del punto teórico de la luz de fuente puntual limitada de difracción determinada por un aumento de la etiqueta en una imagen en la que se observó la etiqueta). En algunas realizaciones, el criterio de la forma de la mancha se evalúa usando el modelo de función de dispersión de puntos. En algunas realizaciones, el el criterio de la forma de la mancha se evalúa usando un algoritmo de segmentación de mancha (*por ejemplo*, una transformación divisoria). Un ejemplo de aplicación de una transformación divisoria se describe en Park *et al.*, 2004, "Automatic Microarray Image Segmentation Based on Watershed Transformation", *Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Conference on Pattern Recognition*, volume 3, pages 786-789,.

En algunas realizaciones, una etapa de segmentación de imagen se lleva a cabo mediante el módulo de identificación de etiqueta 50 en una etiqueta candidata en una imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz para determinar qué píxeles forman la mancha en la imagen de luz generada por la etiqueta, y qué píxeles forman el fondo y que píxeles son solo ruido o artefactos y deben ser eliminados. En algunas realizaciones, se usa un enfoque de segmentación de señal de base espacial pura por el módulo de identificación de etiqueta 50, en el que se coloca un círculo sobre la mancha generada por la etiqueta. En este enfoque, todos los píxeles dentro de este círculo se cuentan como parte de la mancha y todos los píxeles fuera del círculo se utilizan para calcular el fondo. Los píxeles entre los dos círculos corresponden al área de transición entre la mancha y su fondo y se descartan para mejorar la calidad de los datos. En este enfoque, todos los píxeles fuera del círculo dentro del límite de un cuadrado predeterminado se consideran como fondo.

En algunas realizaciones, la segmentación basada en intensidad es usada por el módulo de identificación de etiquetas 50 para validar las etiquetas candidatas. Los métodos de esta categoría usan exclusivamente información de intensidad para segmentar los píxeles de señal del fondo. Tales enfoques asumen que los píxeles de señal son más brillantes en promedio que los píxeles de fondo. Como ejemplo, se supone que la región blanco alrededor de la mancha tomada de la imagen de luz consiste en  $40 \times 40$  píxeles. La mancha es de aproximadamente veinte píxeles de diámetro. Por lo tanto, del total de 1600 ( $40 \times 40$ ) píxeles en la región, aproximadamente  $314 (\pi \times 10^2)$ , ya que el área de un círculo es  $\pi r^2$ , donde  $r$  representa el radio y es la mitad del diámetro) píxeles, o 20% son píxeles de señal y se espera que tengan sus valores de intensidad superiores a los de los píxeles de fondo. Para identificar estos píxeles de señal, todos los píxeles de la región blanco se ordenan en una matriz unidimensional desde el píxel de intensidad más baja hasta la más alta ( $p_1, p_2, p_3, \dots, p_{2500}$ ) en la que  $p_1$  es el valor de intensidad del píxel enésima intensidad más baja entre todos los píxeles. Si no existe contaminación en la región blanco, los 20% superiores de píxeles en el intervalo de intensidad se pueden clasificar como píxeles de señal. En algunas realizaciones, una mancha solo se considera válida si la intensidad medida por el enfoque de segmentación basado en intensidad excede un valor de umbral. Sin embargo, en la presente invención, el tamaño de la mancha en general es sustancialmente menor de veinte píxeles de diámetro, pero el método descrito es aún aplicable.

En algunas realizaciones, la segmentación de Mann-Whitney se utiliza por el módulo de identificación de etiqueta 50 para validar las etiquetas candidatas. La segmentación de Mann-Whitney se describe en Draghici, 2003, *Data Analysis Tools for DNA Microarrays*, Chapman & Hall/CRC, New York, p. 47. El enfoque de segmentación de Mann-Whitney combina el uso de la información espacial con algún análisis basado en la intensidad. Sobre la base del resultado de la operación de localización de mancha realizada por el módulo de identificación de etiqueta 50, se coloca un círculo en la región blanco para incluir la región en la que se espera encontrar la mancha. Debido a que se supone que los píxeles fuera del círculo son el fondo, las propiedades estadísticas de estos píxeles de fondo se pueden usar para determinar

qué píxeles dentro de los círculos son píxeles de señal. Se utiliza una prueba de Mann-Whitney para obtener un nivel de intensidad de umbral que separará los píxeles de señal de otros píxeles (por ejemplo, fondo) incluso si están dentro del área esperada de la mancha. La prueba de Mann-Whitney se describe en Smith, 1991, *Statistical Reasoning*, Tercera Edición, Allyn y Bacon, Boston, págs. 724-730. Los píxeles dentro del círculo que tienen una intensidad más alta que la intensidad del umbral se tratan como señal. En algunas realizaciones, una mancha solo se considera válida si la intensidad medida por el enfoque de segmentación de Mann-Whitney supera un valor umbral.

En algunas realizaciones, se utiliza una segmentación espacial de intensidad combinada (enfoque de mediciones recortadas) por el módulo de identificación de etiquetas 50 para validar las etiquetas candidatas. Este enfoque combina la información espacial y de intensidad en la segmentación de los píxeles de señal desde el fondo de una manera similar al enfoque de Mann-Whitney. En este enfoque, la suposición es que una vez que la mancha para una etiqueta se localiza mediante el módulo de identificación de etiqueta 50 y un círculo blanco se coloca en la región blanco, la mayoría de los píxeles dentro del círculo serán píxeles de señal y a mayoría de los píxeles fuera del círculo serán el fondo. Sin embargo, debido a la irregularidad de forma de la mancha, los píxeles pueden salir fuera del círculo y algunos píxeles de fondo pueden entrar en el círculo. Los píxeles de fondo dentro del círculo se pueden considerar como valores atípicos en la distribución de intensidad de los píxeles de señal. Del mismo modo, los píxeles de señal que caen fuera del círculo también aparecerán como valores atípicos con respecto a la distribución de intensidad de los píxeles de fondo. Los píxeles de contaminación en cualquier lugar aparecerán como valores atípicos en el dominio de intensidad tanto para la señal como para el fondo. Estos valores atípicos pueden cambiar severamente la medición de la intensidad de señal media y total si no se eliminan. Para eliminar el efecto de los valores atípicos en estas mediciones, algunas realizaciones del módulo de identificación de etiquetas 50 simplemente pueden "recortar" un porcentaje fijo de píxeles de la distribución de intensidad de los píxeles para las regiones de señal y fondo. El enfoque de Mann-Whitney realiza un análisis estadístico sobre los píxeles fuera del área de mancha supuesta y luego usa el umbral calculado allí para segmentar los píxeles dentro del área blanco. El enfoque de mediciones recortadas realiza un análisis estadístico de ambas distribuciones (tanto fuera como dentro de la mancha supuesta) y elimina los valores atípicos de cada una de tales distribuciones de forma independiente sin hacer profesión de fe en que las características de la distribución exterior también reflejarán las propiedades de la distribución en el interior. La eliminación de aproximadamente 5-10% de cada distribución permite que este enfoque para hacer frente a los artefactos tales como partículas de polvo y otras impurezas. En realizaciones preferidas, el módulo de identificación de etiquetas 50 no tiene que cuantificar la intensidad de las manchas correspondientes a las etiquetas en las imágenes. Sin embargo, en algunas realizaciones, la intensidad de la etiqueta se cuantifica usando cualquier técnica de cuantificación conocida en la materia, que incluye, pero sin limitación, la intensidad total de la señal, la intensidad de la señal media y la intensidad de la señal mediana. Los ejemplos de técnicas de cuantificación se describen en Draghici, Draghici, 2003, *Data Analysis Tools for DNAMicroarrays*, Chapman & Hall/CRC, New York, Section 3.4.3.

Las técnicas identificadas anteriormente identifican una pluralidad de etiquetas candidatas y validan todas o algunas de estas etiquetas candidatas. Estas se denominan como reglas de nivel de la mancha. En algunas realizaciones, para ser válido, la mancha para una etiqueta debe coincidir con la función de dispersión de puntos de la luz teórica de la luz fuente puntual limitado de difracción. Las manchas se pueden identificar, por ejemplo, por una transformación divisoria. En algunas realizaciones, se registran las manchas que exceden el límite de difracción. A continuación, debido a que puede haber más de una sonda en las imágenes de luz, el módulo de identificación de etiqueta 50 aplica un conocimiento *a priori* sobre la arquitectura de la sonda para determinar qué etiquetas validadas pertenecen a la misma sonda. En esencia, este conocimiento *a priori* se utiliza para formar un modelo de cómo debería parecer una sonda en las imágenes de luz. Este modelo luego se puede reducir a un conjunto de reglas de nivel de reportero que se pueden usar para verificar que un determinado conjunto de etiquetas pertenece a una sonda determinada. Los ejemplos de tales reglas incluyen aplicar un criterio de distancia entre el centroide de una mancha a otro y requerir que las manchas consideradas como pertenecientes a la misma sonda no formen ángulos mayores que una cantidad umbral. En esencia, el modelo esperado se ajusta a las etiquetas validadas observadas. En algunas realizaciones, se considera que un conjunto de etiquetas que da la menor cantidad de error cuando se ajusta a un modelo esperado para una sonda pertenece a la misma sonda.

En algunas realizaciones, el conocimiento *a priori* usado para formular un modelo es la expectativa de que las etiquetas que pertenecen a la misma sonda estarán dispuestas linealmente. En algunas realizaciones, un conjunto de etiquetas se somete a una regresión lineal con el fin de determinar si el conjunto de etiquetas está dispuesto de forma lineal. Si se satisface la regresión lineal, se pueden aplicar otras reglas para validar adicionalmente que el conjunto de etiquetas pertenece a la misma sonda. En algunas realizaciones, un conjunto de etiquetas se considera lineal si se ajustan a un criterio de modelo de regresión lineal. En algunas realizaciones, el conjunto de etiquetas se considera que se ajusta a un criterio de modelo de regresión lineal cuando un valor R para el modelo de regresión es 0,9 o mayor. En algunas realizaciones, como se describe en la presente, se imponen condiciones experimentales (por ejemplo, un campo eléctrico) para garantizar que las sondas estén dispuestas linealmente. En algunas realizaciones, las sondas no están dispuestas linealmente y se invocan modelos más complejos que incorporan la curvatura esperada de la sonda. En algunas realizaciones, la dirección lineal de las sondas sobre el sustrato no se conoce (por ejemplo, no está predeterminada). En algunas realizaciones, la dirección lineal de las sondas sobre los sustratos es conocida (por ejemplo, está predeterminada). En cada una de estas realizaciones, este conocimiento *a priori* se utiliza para formar el modelo. Además de las reglas concernientes a la forma de la sonda (por ejemplo, lineal, curva, lineal en una orientación predeterminada), existen reglas para el espaciado de la etiqueta. Una regla de espaciado impone

restricciones sobre la distancia entre las etiquetas en el conjunto de etiquetas. Otros tipos de reglas se refieren a la forma de las manchas que constituyen el reportero. La forma de la mancha se ha discutido anteriormente en conjunción con algoritmos que están diseñados para localizar manchas y medir la intensidad de la mancha (por ejemplo, una coincidencia entre una forma de la mancha observada y la dispersión teórica de la mancha de la luz  
 5 fuente puntual limitada de difracción determinada por un aumento de la etiqueta, modelo de función de dispersión de puntos, un algoritmo de segmentación de puntos tal como una transformación divisoria).

En algunas realizaciones, el modelo utilizado para identificar las etiquetas que pertenecen a la misma sonda requiere que el espaciado entre cada etiqueta en una sonda sea igual o dentro de un intervalo definido. En un ejemplo, el modelo comprende las reglas que (i) las etiquetas para la sonda están dispuestas de forma lineal y (ii) las etiquetas están  
 10 espaciadas entre 450 y 550 nm entre sí. En algunas realizaciones, el modelo utilizado para identificar las etiquetas pertenecientes a la misma sonda no impone ningún requerimiento de que las etiquetas estén espaciadas igualmente. En efecto, en algunas realizaciones, la información sobre una identidad de sonda está codificada en forma de espaciamiento desigual entre las manchas de la sonda. Además, en algunas realizaciones, la secuencia de cadenas  
 15 codificada por una sonda incluye monómeros marcadores espaciadores que no emiten luz en ninguna de las longitudes de onda medidas en la pluralidad de imágenes de luz. La presente invención no impone limitaciones al espaciado entre monómeros de marcadores. Sin embargo, una vez que se sintetizan los nanoindicadores, el conocimiento *a priori* sobre los nanoindicadores se puede usar para construir el modelo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un modelo impone la restricción de que las etiquetas pertenecientes a la sonda están espaciadas entre  
 20 100 nm y 150 nm entre sí, entre 150 nm y 200 nm entre sí, entre 200 nm y 250 nm entre sí, entre 250 nm y 300 nm entre sí, entre 350 nm y 400 nm entre sí, entre 400 nm y 450 nm entre sí, entre 450 nm y 500 nm entre sí, entre 500 nm y 550 nm entre sí, o entre 550 nm y 600 nm entre sí. En algunas realizaciones, el espaciado entre los monómeros marcadores es desigual pero es conocido. Por ejemplo, en una nanocadena de cuatro etiquetas, el espaciado entre primera etiqueta y la segunda etiqueta es 400 nm, el espaciado entre la segunda etiqueta y la tercera etiqueta es 750 nm, y el espaciado entre la tercera etiqueta y la cuarta etiqueta es 625 nm. Esta información de  
 25 espaciamiento se debe tomar en cuenta al construir un modelo para esta clase de nanocadena.

En modelos en los que las etiquetas están espaciadas equitativamente, el modelo se ajusta a las etiquetas observadas y el modelo se cumple si las etiquetas observadas se hallan dentro de tolerancias predeterminadas. En algunas realizaciones, los modelos utilizados para identificar las etiquetas pertenecientes a la misma sonda incluyen reglas de ángulo. Por ejemplo, se debe considerar el caso de una nanocadena de cuatro etiquetas. En algunas realizaciones, un  
 30 modelo para esta nanocadena impondrá una restricción de ángulo tolerable más grande, de tal manera que ninguna de las tres etiquetas de la nanocadena forma un ángulo mayor que la restricción de ángulo tolerable más grande.

En algunas realizaciones, un módulo de identificación de etiqueta aplica un primer criterio de distancia entre un centroide de una primera etiqueta y un centroide de una segunda etiqueta en una pluralidad de etiquetas. En algunas realizaciones, el primer criterio de distancia se determina mediante una distancia calculada entre una primera etiqueta y una segunda etiqueta en la sonda. En algunas realizaciones, el módulo de identificación de etiqueta aplica un segundo criterio de distancia entre un centroide de la segunda etiqueta y un centroide de una tercera etiqueta en la pluralidad de etiquetas. El segundo criterio de distancia se puede determinar, por ejemplo, mediante una distancia calculada entre una segunda etiqueta y una tercera etiqueta en la sonda. En algunas realizaciones, el primer criterio de distancia es el mismo que el segundo criterio de distancia. En algunas realizaciones, el primer criterio de distancia es diferente del segundo criterio de distancia. En algunas realizaciones, un valor del primer criterio de distancia y un valor del segundo criterio de distancia contribuyen a determinar si la pluralidad de etiquetas es la sonda.  
 40

En algunas realizaciones, las instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas comprenden instrucciones para identificar una zona tamponante alrededor de una porción del sustrato que tiene etiquetas seleccionadas. Una zona tamponante es una región del sustrato que no contiene etiquetas. Una zona tamponante rodea una porción del sustrato que tiene un conjunto de etiquetas. La identificación de una zona tamponante alrededor de un conjunto de etiquetas asegura que el conjunto de etiquetas rodeado por la zona tamponante es en efecto un conjunto de etiquetas que potencialmente corresponde a una sonda. Si no se puede identificar una zona tamponante alrededor de un conjunto dado de etiquetas, el conjunto dado de etiquetas podría ser potencialmente de dos o más sondas que están próximas entre sí en el sustrato. Esto no es un resultado deseable porque no lleva a la identificación apropiada de la sonda. Por lo tanto, el uso de un criterio de zona tamponante puede ayudar a asegurar que un conjunto dado de etiquetas pertenece a una sonda única. En efecto, en algunas realizaciones un conjunto de etiquetas identificadas en el sustrato no se consideran etiquetas validadas a menos que haya una zona tamponante alrededor del conjunto de etiquetas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un conjunto de etiquetas aún se pueden considerar etiquetas "candidatas" a menos que y hasta que se cumpla el criterio de la zona tamponante. En algunas realizaciones, la zona tamponante es alargada en forma de modo que se ajustará alrededor de una matriz lineal de manchas que representan una sonda posible.  
 55

*Módulo de identificación de sonda 54.* Una vez que el módulo de identificación de etiqueta 50 identifica una sonda candidata en el sustrato, el módulo de identificación de sonda 54 determina si la secuencia de cadenas definida por las etiquetas de la sonda candidata identificada constituye una secuencia indicadora válida. Cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas se confirma como una secuencia indicadora válida, se considera que la pluralidad de etiquetas es la sonda. Cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas no se confirma como una secuencia indicadora válida, se considera que la pluralidad de etiquetas no es la sonda. En tales  
 60

realizaciones, el módulo de identificación de sonda 54 compara la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas con secuencias indicadoras válidas en una tabla de consulta. En realizaciones preferidas, la tabla de consulta incluye una lista de todas las posibles secuencias de cadenas válidas. La premisa detrás de la tabla de consulta es que solo algunos de los posibles conjuntos de secuencias de cadena se utilizan realmente. Por ejemplo, se debe considerar el caso donde se construyen nanocadenas (sondas) con cuatro monómeros marcadores y cada monómero marcador puede adoptar uno de cuatro colores diferentes (por ejemplo, rojo, verde, azul y blanco). En este caso, existen  $4^4 = 64$  posibles secuencias de cadenas. Es decir que solo veinte de estas secuencias de cadena se utilizan realmente en la muestra expuesta al sustrato. En tales realizaciones, se puede ingresar en la tabla de consulta estas veinte secuencias de cadena. Si el módulo de identificación de etiqueta 50 identifica una sonda en el sustrato que tiene una secuencia de cadenas que coincide con una de estas veinte secuencias de cadena, la sonda se puede validar. Si el módulo de identificación de etiqueta 50 identifica una sonda sobre el sustrato que tiene una secuencia de cadenas que no coincide con una de estas veinte secuencias de cadena veinte, la sonda se puede descartar como un artefacto. En muchas realizaciones, el número de secuencias de cadenas en la tabla de consulta es una pequeña fracción del número posible de secuencias de cadena. Esta condición ayuda a asegurar que solo se identifican sondas válidas en el sustrato. En algunas realizaciones, la sonda tiene siete etiquetas, cada etiqueta que adopta uno de cuatro colores diferentes para un total de  $7^4$  secuencias de cadena diferentes, una pequeña fracción de las cuales se utilizan para construir nanoindicadores reales. En algunas realizaciones, una sonda tiene veinte etiquetas, cada etiqueta que adopta uno de veinte colores diferentes para un total de  $20^{20}$  secuencias indicadoras válidas diferentes, una pequeña fracción de las cuales se utilizan para construir nanoindicadores reales. Estos ejemplos de realizaciones sirven simplemente para ilustrar las dimensiones de algunas realizaciones de la presente invención. Como se indicó anteriormente, se puede usar un intervalo de etiquetas más grande en un nanoindicador dado y cada una de tales etiquetas puede adoptar muchos colores diferentes. En algunas realizaciones, existen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más etiquetas en una sonda y cada etiqueta puede adoptar cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más colores diferentes. En algunas realizaciones, existen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más etiquetas en una sonda y cada etiqueta puede adoptar cualquiera de dos de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más colores diferentes. En algunas realizaciones, existen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más etiquetas en una sonda y cada etiqueta puede adoptar cualquiera de tres de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más colores diferentes. En algunas realizaciones, existen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más etiquetas en una sonda y cada etiqueta puede adoptar múltiples colores (*por ejemplo*, 2 colores, 3 colores, 4 colores) en una pluralidad de colores. En algunas realizaciones, esta pluralidad de colores consiste en cinco o más colores, seis o más colores, siete o más colores, entre siete y cien colores, o más de veinte colores. En algunas realizaciones, un color es un intervalo de longitud de onda diferenciado (*por ejemplo*, 340 nm a 350 nm, 355 nm a 365 nm, *etc.*).

En algunas realizaciones, un primer subconjunto de las etiquetas en la secuencia de cadenas definida por una sonda sirve para comprobar el error de las identidades de las etiquetas en un segundo subconjunto de las etiquetas en la secuencia de cadenas. Por ejemplo, se debe considerar el caso en que hay ocho etiquetas en una sonda. Las últimas dos etiquetas pueden servir para comprobar errores de la identidad de las primeras seis etiquetas. Por ejemplo, las últimas dos etiquetas en la secuencia de cadenas pueden servir como suma de comprobación para las primeras seis etiquetas de la secuencia de cadena. En algunas realizaciones, los valores de la suma de comprobación se pueden usar para corregir errores en una secuencia de cadenas que ha sido mal leída por el módulo de identificación de etiqueta 50. En consecuencia, en algunas realizaciones, es posible validar una secuencia de cadenas que no está presente en la tabla de consulta aplicando técnicas de corrección de errores a la secuencia de cadenas usando la suma de comprobación u otra forma de código de corrección de errores presente en la secuencia de cadena.

En algunas realizaciones, donde la información de distancia codifica en parte la identidad de cadena, la tabla de consulta comprende secuencias indicadoras válidas, donde cada una de tales secuencias indicadoras válidas comprende información de distancia entre las etiquetas además de una secuencia de cadena. En tales realizaciones, debe haber una coincidencia entre la información de distancia y la secuencia de cadenas con el fin de identificar una sonda válida. Por ejemplo, se debe considerar el caso en el que la secuencia de cadenas identificada por el módulo de identificación de etiqueta 50 consiste en tres etiquetas, donde la distancia entre la primera y segunda etiqueta es  $d_1$  y la distancia entre la segunda y tercera etiqueta es  $d_2$ . En este ejemplo, el módulo de identificación de sonda debe encontrar una secuencia de cadenas en la tabla de consulta 56 que codifica la misma secuencia de cadenas y tiene distancias  $d_1$  y  $d_2$  coincidentes entre las primeras y segundas etiquetas y las segundas y terceras etiquetas respectivamente.

En algunas realizaciones, el módulo de identificación de etiqueta 50 comprende Instrucciones para repetir las instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas una pluralidad de veces. Cada vez que se repiten las instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas, se identifica una pluralidad diferente de etiquetas, en la pluralidad de imágenes de luz 46, que están próximas entre sí sobre el sustrato. En tales realizaciones, el módulo de identificación de sonda 54 determina si cada una de tal pluralidad de etiquetas diferentes identificadas por el módulo de identificación de etiqueta 50 comprende una secuencia indicadora válida. Para cada una de tales pluralidades de etiquetas diferentes, el módulo de identificación de sonda 54 estima que la pluralidad de etiquetas diferentes es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas diferentes se confirma como una secuencia indicadora válida. Además, el módulo de identificación de sonda 54 estima que la pluralidad de etiquetas diferentes no es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas diferentes no se confirma como una

secuencia indicadora válida. En algunas realizaciones, se identifica una pluralidad de sondas. En algunas realizaciones, la pluralidad de sondas consiste en tres o más sondas, dos o más sondas, tres o más sondas, diez o más sondas, al menos 5, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ó 400 sondas o más. En algunas realizaciones, módulo de identificación de sonda 54 almacena cada tipo de sonda identificada. Un "tipo" de sonda se identifica mediante la secuencia de cadenas de la sonda. En algunas realizaciones, el modelo de identificación de sonda 54 almacena cada secuencia de cadenas de cada pluralidad de etiquetas diferentes que no se confirma como una secuencia indicadora válida. En algunas realizaciones, el modelo de identificación de sonda 54 almacena cada secuencia de cadenas de cada pluralidad de etiquetas diferentes que se confirma como una secuencia de reportero válida.

#### 5.16 Aplicaciones de tecnología de nanoindicador

- 10 Las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para fines de diagnóstico, pronóstico terapéutico y análisis. La presente invención proporciona la ventaja de que muchas moléculas diana diferentes se pueden analizar de una vez a partir de una única muestra biomolecular usando los métodos de la invención. Esto permite, por ejemplo, realizar varias pruebas de diagnóstico en una muestra.

##### 5.16.1 Métodos de diagnóstico/pronóstico

- 15 Los presentes métodos se pueden aplicar al análisis de las biomoléculas simples obtenidas o derivadas de un paciente para determinar si un tipo celular enfermo está presente en la muestra y/o para clasificar la enfermedad. Por ejemplo, se puede analizar una muestra de sangre de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente para determinar la presencia y/o cantidad de marcadores de un tipo de células cancerosas en la muestra, de este modo se diagnostica o clasifica el cáncer. Alternativamente, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para diagnosticar infecciones patógenas, por ejemplo infecciones por virus y bacterias intracelulares, mediante la determinación de la presencia y/o cantidad de marcadores de bacteria o virus, respectivamente, en la muestra. De este modo, las moléculas diana detectadas usando las composiciones y métodos de la invención pueden ser marcadores de pacientes (tales como un marcador de cáncer) o marcadores de infección con un agente extraño, tales como marcadores bacterianos o virales. Debido a la naturaleza cuantitativa de los nanoindicadores, las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para cuantificar moléculas diana cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o condición de enfermedad, por ejemplo, marcadores sanguíneos que se regulan por aumento o regulan por disminución como resultado de un estado de enfermedad.

- Además, las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para proporcionar información pronóstica que ayude a determinar un curso de tratamiento para un paciente. Por ejemplo, la cantidad de un marcador particular para un tumor se puede cuantificar con exactitud incluso a partir de una pequeña muestra de un paciente. Para ciertas enfermedades como el cáncer de mama, la sobreexpresión de ciertos genes, como Her2-neu, indican que se necesitará un tratamiento más agresivo.

##### 5.16.2 Métodos de detección

- Los métodos de la presente invención se pueden usar, entre otros, para determinar el efecto de una perturbación, que incluye compuestos químicos, mutaciones, cambios de temperatura, hormonas de crecimiento, factores de crecimiento, enfermedad o un cambio en las condiciones de cultivo, sobre varias moléculas diana, de este modo se identifican moléculas diana cuya presencia, ausencia o niveles son indicativos de estados biológicos particulares. En una realización preferida, se utiliza la presente invención para dilucidar y descubrir componentes y vías de estados de enfermedad. Por ejemplo, la comparación de cantidades de moléculas diana presentes en un tejido de enfermedad con tejido "normal" permite la dilucidación de moléculas diana importantes implicados en la enfermedad, de este modo se identifican blancos para el descubrimiento/detección de nuevos fármacos candidatos que se pueden usar para tratar la enfermedad.

#### 5.17 Métodos para identificar sondas

- Un aspecto de la invención proporciona métodos para detectar la presencia de una sonda dentro de una muestra superpuesta sobre un sustrato. En este aspecto de la invención, la sonda comprende una pluralidad de etiquetas dispuestas espacialmente. En uno de estos métodos, se identifica una pluralidad de etiquetas, en una pluralidad de imágenes de luz, que están próximas entre sí sobre el sustrato. El orden espacial de la pluralidad de etiquetas determina una secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas. Cada imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz es para la luz recibida de la muestra en un intervalo de longitud de onda en una pluralidad de intervalos de longitud de onda diferentes. En el método, se realiza una determinación de si la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas comprende una secuencia indicadora válida. Cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas se confirma como una secuencia indicadora válida, se considera que la pluralidad de etiquetas es la sonda. Cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas no se confirma como una secuencia indicadora válida, se estima que la pluralidad de etiquetas no es la sonda.

- En algunas realizaciones, la etapa determinante comprende comparar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas con secuencias indicadoras válidas en una tabla de consulta. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente almacenar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas que no se confirma como una secuencia indicadora válida. Por ejemplo, la secuencia de cadenas se puede almacenar en una memoria

electrónica. En algunas realizaciones, el método comprende además alinear una primera imagen de luz con una segunda imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz usando una pluralidad de referencias presentes en el sustrato.

- 5 En algunas realizaciones, la etapa de identificación de una pluralidad de etiquetas se repite una pluralidad de veces. Cada vez que se repite una etapa de identificación de una pluralidad de etiquetas, se identifica una pluralidad diferente de etiquetas, en la pluralidad de imágenes de luz, que están próximas entre sí sobre el sustrato. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente determinar si cada una de la pluralidad de etiquetas diferentes comprende una secuencia indicadora válida. Se considera que cada pluralidad de etiquetas diferentes es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas diferentes se confirma como una secuencia indicadora válida. Además, se considera que cada pluralidad diferente de etiquetas no es una sonda cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad diferente de etiquetas no se confirma como una secuencia indicadora válida. En algunos casos de acuerdo con la realización de la presente invención, se identifica una pluralidad de sondas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, dos o más sondas, tres o más sondas, diez o más sondas, al menos se identifican 5, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ó 400 sondas o más.
- 10
- 15 En algunas realizaciones donde se identifica una pluralidad de sondas, se registra cada tipo de sonda identificada. Un "tipo" de sonda se identifica por la secuencia de cadenas de la sonda. Cada secuencia de cadenas válida única representa un tipo de sonda diferente. En algunas realizaciones, se almacena cada secuencia de cadenas de cada pluralidad de etiquetas diferentes que no se confirma como una secuencia indicadora válida. De esta manera, es posible determinar los errores comunes que surgen en las sondas sobre el sustrato. Un tipo de error que se puede identificar mediante el seguimiento de las pluralidades de etiquetas que no forman secuencias de cadenas válidas es la condición en la que hay demasiadas sondas en el sustrato. Cuando hay demasiadas sondas en el sustrato, las etiquetas de las sondas vecinas se aproximan entre sí, lo que dificulta determinar a qué sonda pertenece cada etiqueta. Otro tipo de error que se puede identificar es la condición en la que un número excesivo de sondas se fragmentan, lo que deja sondas truncadas en el sustrato. En algunas realizaciones, se rastrean todas las especies de etiquetas, cadenas, secuencias indicadoras no válidas, secuencias indicadoras válidas, tipos de sondas en los métodos de la presente invención.
- 20
- 25

## 6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar esta invención y no se deben interpretar en modo alguno como limitantes del alcance de esta invención.

### 30 6.1 EJEMPLO 1: INMOVILIZACIÓN SELECTIVA DE ADN EXTENDIDA

Un híbrido de ARN-ADN de cadena doble de 7,2 Kb de longitud se funcionaliza en un extremo terminal con biotina. En el otro extremo terminal, el ADN comprende una secuencia de cadenas única de 15 bases repetidas 4 veces (5'-GTC TAT CAT CAC AGC GTC TAT CAT CAC AGC GTC TAT CAT CAC AGC-3'; SEQ ID NO: 2). Por lo tanto, el ADN comprende cuatro sitios de unión en un extremo terminal para inmovilización selectiva. El híbrido también tiene cuatro regiones con fluoróforos Cy3 incorporados en el ARN.

35

Se transfiere una pequeña muestra del ADN (3  $\mu$ L, 0,01 fmol/ $\mu$ L en IX TAE, o Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) en un dispositivo microfluídico que comprende un canal moldeado en polidimetilsiloxano que se adhiere pasivamente a un cubreobjetos recubierto de estreptavidina (Accelr8, TB0200). Las dimensiones del canal son 50  $\mu$ m x 1 mm x 10 mm. Ver la figura 15A. La muestra se pone en contacto con el cubreobjetos a temperatura ambiente durante 15 minutos, se deja que el ADN se una selectivamente a la superficie de estreptavidina por medio de la biotina en el extremo terminal del ADN. El ADN no unido se lava con el flujo de fluido. El tampón IX TAE en los pocillos se intercambia por tampón fresco y los niveles de fluido se igualan a 30  $\mu$ L cada pocillo. Ver la Figura 4A.

40

Se aplica un campo eléctrico de 200 V/cm para extender el ADN cargado negativamente largo (ver la Figura 15B) hacia el electrodo positivo.

45 Se añade un agente de inmovilización, un oligonucleótido biotinilado (5'-Biotina GCTGTGATGATAGAC-3', SEQ ID NO: 3, 50  $\mu$ L a 100 nM, IX TAE) complementario al segundo extremo terminal del ADN al pocillo negativo. El volumen adicional eleva el nivel de fluido en el pocillo e induce el flujo hidrostático para introducir el reactivo de la inmovilización en el canal (ver Figura 15C). El flujo también actúa para estirar adicionalmente el ADN además del campo eléctrico.

50 El oligonucleótido biotinilado se hibrida con el segundo extremo terminal del ADN mientras se extiende y se une selectivamente a la estreptavidina del cubreobjetos. La muestra se puede inmovilizar efectivamente en un estado extendido en menos de 5 minutos.

[Examen de imágenes de macromoléculas extendidas inmovilizadas selectivamente. Una macromolécula que comprende etiquetas de fluoróforos y etiquetas de afinidad de biotina se prepara y se purifica de acuerdo con los ejemplos proporcionados a continuación. La macromolécula está ligada a una superficie del cubreobjeto que representa una biotina y se extiende con un campo eléctrico. La macromolécula finalmente se ilumina con una lámpara de arco y se visualiza con una cámara. Se proporciona un ejemplo de imagen en la Figura 16. Las matrices individuales y de forma significativa, se puede detectar el orden de las matrices en macromoléculas individuales en la

55

imagen.

*Preparación y examen de imágenes de macromoléculas extendidas inmovilizadas selectivamente.* En la presente es un ejemplo etapa a etapa de la construcción de un nanoindicador de varios componentes. Se puede apreciar que varios componentes se pueden construir o añadir al mismo tiempo, antes o después de otros componentes. Por ejemplo, el apareamiento de unidades de parche o aletas a un andamio se puede realizar simultáneamente uno después de otro. En este ejemplo, el material de partida es un vector viral circular M13mp18. Usando una cadena lineal única M13mp18, las unidades de parche se aparean a este para formar un andamio de doble cadena. A continuación, se añaden las aletas y luego se liga una secuencia específica de la diana. Mientras tanto, las etapas de purificación ayudan a filtrar el exceso de unidades de parche y aletas no unidos. También se describen las construcciones de ácidos nucleicos marcados (parches y/o aletas y/u otros oligonucleótidos marcados) que se unen al nanoindicador. Después de la unión (por ejemplo, mediante hibridación) de una molécula diana, los nanoindicadores se unen a una superficie y se extienden. Finalmente los nanoindicadores se visualizan mediante una cámara. Se generaron nanoindicadores y se emplearon con éxito para detectar moléculas diana usando métodos sustancialmente, como se describe en este ejemplo.

*Construcción de andamio.* La secuencia del andamio de oligonucleótidos seleccionada se analizó usando el software Vector NTI®. En primer lugar, se preparó un ácido nucleico de cadena única a partir de la linealización de un ADN de cadena simple M13mp18 circular, que se adquirió comercialmente de New England Biolabs. El ML3mp18 circular se digirió con enzima BamHI para linealizarla. Los materiales usados consistieron en el vector M13mp18 (250 ng/μl), Patch\_1L\_BamH1.02 (dilución 10 μl en un patrón de 100 μM), tampón BamHI 10X, enzima BamHI. El protocolo para preparar 0,8 pmol total de M13mp18 lineal implica las siguientes etapas. 1) precalentar el bloque de calefacción a 37 °C; 2) en un tubo eppendorf de 0,65 ml combinar 40 μl de 250 ng/μl de vector M13mp18, 2 μl de Patch\_1L\_BamH1.02 10 μM y 5 μl de tampón 10X BamH1; 3) colocar el tubo eppendorf en el bloque de calentamiento de 37 °C con el papel aluminio en la parte superior. Incubar el tubo a 37 °C durante 15 minutos para permitir que la unidad de parche se hibride con el andamio M13mp18; 4) después de 15 minutos añadir 2 μl de enzima BamH1 y dejar el digesto de la reacción a 37 °C durante 30 minutos, después de lo cual se añaden 2 μl adicionales de enzima BamH1 y dejar que la reacción continúe digiriendo durante 30 minutos a 37 °C (el volumen final de la enzima BamH1 es del 8%); y 5) alicuotar 10 μl en tubos eppendorf de 0,65 ml y almacenar y congelar (la concentración final de M13mp18 lineal es 200 ng/μl).

*Preparación de una unidad de parche de las mezclas de parche de base (BPP).* En segundo lugar, las unidades de parche se preparan en mezclas. Las secuencias de oligonucleótidos de parche se seleccionaron para una longitud óptima y homología/no homología deseada a la cadena M13mp18 y secuencia genómica humana. Los parches fueron oligonucleótidos comercialmente fabricados (adquiridos de tecnologías de ADN integradas) con 60 o 65 bases de nucleótidos de longitud. Quince bases de nucleótidos de cada oligonucleótido de parche son complementarios con el ADN de cadena simple de M13mp18, 10 bases de nucleótidos son complementarias con a un parche adyacente y 5 nucleótidos pares de bases son complementarias con una aleta correspondiente. La coincidencia de 10 pares de bases de nucleótidos entre los parches forma una estructura de tallo que estabiliza la estructura y ayuda a levantar las aletas fuera del andamio cubierto para que sean más accesibles para unirse a los oligonucleótidos marcados. Los sitios de unión sintéticos, las cinco bases de nucleótidos, sobre los parches para la unión a las aletas realizan el aprovechamiento de la potencia de un sistema modular posible.

Las mezclas de parches de base contienen nueve unidades de parche, todas las cuales corresponden a una agrupación de letras específicas y posición en el nanoindicador. Para este ejemplo, hay cuatro colorantes de fluorescencia diferentes (color) marcados A, B, C y D y 8 posiciones diferentes o regiones en las que los ácidos nucleicos marcados se pueden unir en un nanoindicador. Por ejemplo, BPP A3 corresponde a todas las unidades de parche A en la posición 3 (unidades de parche 19-27) en el nanoindicador.

Las posiciones de nanoindicador son las siguientes:

Posición 1: unidades de parche 1 -9 (A o C)

Posición 2: unidades de parche 10-18 (B o D)

Posición 3: unidades de parche 19-27 (A o C)

Posición 4: unidades de parche 28-36 (B o D)

Posición 5: unidades de parche 37-45 (A o C)

Posición 6: unidades de parche 46-54 (B o D)

Posición 7: unidades de parche 55-63 (A o C)

Posición 8: unidades de parche 64-72 (B o D)

Materiales: parches derecho e izquierdo, prefusionados entre sí (cada oligonucleótido está en una concentración de 10

## ES 2 620 398 T3

5  $\mu\text{M}$ ). Materiales para preparar 100  $\mu\text{mol}$  de BPP 1: (en la posición 1, coordenada de parche 1L se usa para el digesto de BamHI – este parche no está incluido en BPP 1): 10  $\mu\text{l}$  de cada unidad de parche prefusionada (10  $\mu\text{M}$ /cada una) (coordenadas 2-9), 5  $\mu\text{l}$  [20  $\mu\text{M}$ ] de Patch\_IR (A o C). La concentración final de cada parche es de 1,18  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ .  
Materiales para preparar 100  $\mu\text{l}$  de BPP 2-8: 10  $\mu\text{l}$  de cada unidad de parche prefusionada (10  $\mu\text{M}$ /cada una) apropiada. Hay 9 unidades de parche añadidas a cada una o 90  $\mu\text{l}$  en total. La concentración final de cada parche es de 1,11  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ .

10 Abajo sigue una tabla de todos los pools de unidades de parche preparados para este ejemplo, con 8 posiciones o regiones para los ácidos nucleicos marcados con tinta para unirse en el nanoindicador. Las posiciones 1, 3, 5 y 7 se pueden unir con ácido nucleico marcado con la tinta A o la tinta C y una posición 2, 4, 6 y 8 se puede unir con ácido nucleico marcado con la tinta B o la tinta D.

Tabla de pools de parches básicos resultantes (corresponden a etiquetas en tubos)

BPP-A1 [Preapareado, Color=A, Coordenadas 1-9]

Patch\_(1-9)R.A

Patch\_(2-9)L

15 BPP-B2 [Preapareado, Color=B, Coordenadas 10-18]

Patch\_(10-18)R.B

Patch\_(10-18)L

BPP-A3 [Preapareado, Color=A, Coordenadas 19-27]

Patch\_(19-27)R.A

20 Patch\_(19-27)L

BPP-B4 [Preapareado, Color=B, Coordenadas 28-36]

Patch\_(28-36)R.B

Patch\_(28-36)L

BPP-A5 [Preapareado, Color=A, Coordenadas 37-45]

25 Patch\_(37-45)R.A

Patch\_(37-45)L

BPP-B6 [Preapareado, Color=B, Coordenadas 46-54]

PatchJ46-54)R.B

Patch\_(46-54)L

30 BPP-A7 [Preapareado, Color=A, Coordenadas 55-63]

Patch\_(55-63)R.A

Patch\_(55-63)L

BPP-B8 [Preapareado, Color=B, Coordenadas 64-72]

Patch\_(64-72)R.B

35 Patch\_(64-72)L

BPP-C1 [Preapareado, Color=C, Coordenadas 1-9]

Patch\_(1-9)R.C

Patch\_(2-9)L

BPP-D2 [Preapareado, Color=D, Coordenadas 10-18]

40 Patch\_(10-18)R.D

- Patch\_(10-18)L  
 BPP-C3 [Preapareado, Color=C, Coordenadas 19-27]  
 Patch\_(19-27)R.C  
 Patch\_(19-27)L
- 5 BPP-D4 [Preapareado, Color=D, Coordenadas 28-36]  
 Patch\_(28-36)R.D  
 Patch\_(28-36)L  
 BPP-C5 [Preapareado, Color=C, Coordenadas 37-45]  
 Patch\_(37-45)R. C
- 10 Patch\_(37-45)L  
 BPP-D6 [Preapareado, Color=D, Coordenadas 46-54]  
 Patch\_(46-54)R.D  
 Patch\_(46-54)L  
 BPP-C7 [Preapareado, Color=C, Coordenadas 55-63]  
 Patch\_(55-63)R.C
- 15 Patch\_(55-63)L  
 BPP-D8 [Preapareado, Color=D, Coordenadas 64-72]Patch\_(64-72)R.D  
 Patch\_(64-72)L

- 20 *Materiales y preparación para fusión del oligonucleótido monocatenario con unidades de parche para un andamio bicatenario.* En tercer lugar, las unidades de parche se preparan para ser fusionadas con el M13mp18 lineal monocatenario, cubriendo la cadena para hacer un andamio de oligonucleótido bicatenario. Las condiciones para la fusión de 60 y 65 parches de bases de nucleótidos con M13mp18 tienen que suceder a altas concentraciones de sal de modo que la unión será muy específica y los parches no se fusionarán con una coordenada incorrecta en la cadena M13mp18. Para la etapa de fusión, cada unidad de parche se añade en una relación de 2:1 a 4:1 con la secuencia monocatenaria M13mp18 con un volumen total de 0,5  $\mu\text{mol}$ . El excedente de parches se remueve antes de las aletas de fusión.
- 25

- Los materiales usados consistían en 20x SSC, M13mp18 lineal (BamHI digerido a 0,08  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  o 200 ng/ $\mu\text{l}$ ), pools de parches de bases apropiados (BPP) (se necesitan 8 en total a 1,11  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ , ver con anterioridad) y bloque de calor digital fijado a 45 °C. La reacción de fusión se llevó a cabo de la siguiente manera. Directivas generales: 2X cada unidad de parche por molécula M13mp18, aletas preligadas/parches (en posición 1 u 8) agregadas para purificación posterior y 5X SSC. La reacción de ejemplo (0,5  $\mu\text{mol}$  de andamio con aletas de gancho F8) consiste en: 7,1  $\mu\text{l}$  de BamHI digerido cadena M13mp18 a 0,071  $\mu\text{M}$ , 0,9  $\mu\text{l}$  de cada nuevo pool de parche de pase a 1,11  $\mu\text{M}$  para las primeras 7 posiciones: A1, B2, A3, B4, C5, B6 y A7:
- 30

- 1,7  $\mu\text{l}$  de A1 BPP (prefusionado, 12/15; a 1,18  $\mu\text{M}$ /cada parche)
- 35 1.8  $\mu\text{l}$  de B2 BPP (prefusionado, 12/15; a 1,11  $\mu\text{M}$ /cada parche)  
 1.8  $\mu\text{l}$  de A3 BPP (prefusionado, 12/15; a 1,11  $\mu\text{M}$ /cada parche)  
 1.8  $\mu\text{l}$  de B4 BPP (prefusionado, 12/15; a 1,11  $\mu\text{M}$ /cada parche)  
 1.8  $\mu\text{l}$  de C5 BPP (prefusionado, 12/15; a 1,11  $\mu\text{M}$ /cada parche)  
 1.8  $\mu\text{l}$  de B6 BPP (prefusionado, 12/15; a 1,11  $\mu\text{M}$ /cada parche)
- 40 1.8  $\mu\text{l}$  de A7 BPP (prefusionado, 12/15; a 1,11  $\mu\text{M}$ /cada parche),

2,4  $\mu\text{l}$  de BPP-D8 (pool de las primeras siete unidades de parche — coordenadas 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70 en la posición 8 — especificidad "D") con rótulos de purificación - F8 (FHF, que se fusionan con las coordenadas de parches 71L, 71R, 72L, 72R, 73L logrando aletas de división total/unidades de parche que tienen especificidad "F" para usar como ligadores de biotina, en la posición F8) a 0,83  $\mu\text{M}$  y 7,3  $\mu\text{l}$  20X SSC. El volumen de reacción final será de 29,3  $\mu\text{l}$

a 0,027  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ .

El oligonucleótido anti-Bam también se añade para aparearse a la región en M13 que es complementaria a la unidad de parche 1 L (faltante) y para evitar la recircularización del andamio M13 durante el ligamiento.

5 Apareamiento de unidades de parche a m130p18 de cadena única para formar un andamio de cadena doble. La cuarta etapa implica el protocolo para aparear las unidades de parche a la cadena lineal monocatenaria M13mp18, que cubre la cadena con el fin de preparar un andamio de oligonucleótido de cadena doble, se realiza en las siguientes etapas: 1) precalentar el bloque de calentamiento a 42 °C, calentar la solución de reacción anterior a 45 °C en pequeños tubos de PCR (o tira) con papel aluminio sobre la parte superior durante 15 minutos, girar el bloque de calentamiento a 65 °C e incubar durante 1 hora más y 45 minutos y retirar los tubos, colocar en hielo o congelar.

10 *Purificación del andamio de nanoindicadores usando perlas biotina y magnética con estreptavidina.* La quinta etapa ocurre antes de unir las aletas, donde las unidades de parche en exceso que no se han apareado a la cadena de M13mp18 están separadas del andamio de oligonucleótidos de cadena doble. Una etiqueta de purificación con una región homóloga de cinco bases de nucleótidos con algunas de las unidades de parche complementaria con los de cinco bases de nucleótidos de la proyección se aparea con el 'gancho' del andamio. Los oligonucleótidos biotinilados se aparea a la 'etiqueta de purificación' y las perlas magnéticas con estreptavidina se usan para capturar el andamio  
15 usando oligonucleótidos biotinilados. Las unidades de parche en exceso se eliminan con el sobrenadante. El andamio funde las perlas magnéticas en solución para la recuperación

20 *Fusión de receptores de d-biotina con los rótulos de purificación.* Fusionar los receptores de D-biotina con los rótulos de purificación en el nanoindicador (haciendo 2X para obtener las posiciones de aleta D8 disponibles en solución, que es 2X a M13 o 4X final): 0,5  $\mu\text{mol}$  X 25 posiciones de gancho de oligonucleótidos (5 multiplicados por 5), 4X hace 50 pmols se traduce en 0,50  $\mu\text{l}$  de 100 pmol/  $\mu\text{l}$  de D-biotina, añadir 0,5  $\mu\text{l}$  (D, E, F) - biotina (a 100  $\mu\text{M}$ ) a la muestra, mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

25 *Protocolo de purificación para lavar las unidades de parche no unidas del andamio bicatenario.* Fusionar los oligonucleótidos de gancho F en un exceso de 25 veces con los nanoindicadores en 5X SSC durante 30 min a temperatura ambiente. Pipetear 200  $\mu\text{l}$  de solución de perlas DynaBead MyOne Streptavidin™ en tubos de 1,5 ml, colocar sobre imán y remover el sobrenadante. Lavar dos veces con 5X SSC por resuspensión y clarificar con imán como en la etapa anterioridad. Añadir 80  $\mu\text{l}$  de muestra en 5X SSC (80 fmoles de muestra en este ejemplo). Resuspender bien, colocan en vórtex durante 15 minutos. Clarificar la solución con imán y transferir el sobrenadante a tubos frescos para posterior análisis en gel. Mientras que están en el imán, lavar los pellets (no resuspender) con 80  $\mu\text{l}$   
30 de TE pipeteando sobre el pellet tres veces con el mismo volumen de 80  $\mu\text{l}$  originalmente añadido. Remover el lavado, colocar en tubos recién lavados para análisis. Calentar el tampón TE hasta 45 °C, añadir 80  $\mu\text{l}$  a cada pellet y resuspender. Colocar tubos en bloque de calor de 45 °C durante 15 minutos, pipeteando hacia arriba/hacia abajo una vez para asegurar que las perlas queden suspendidas. Inmediatamente clarificar el producto con imán, mientras que está caliente y seguro. La mayor parte de los nanoindicadores nanoindicadores deberían estar presentes en este producto eluido a 45 °C.  
35

40 *Fusión y ligación de aletas con el andamio.* La sexta etapa implica la división de los oligonucleótidos de aleta que se fusionan con el andamio para hacer un 'andamio cubierto'. La purificación con perlas magnéticas se lleva a cabo luego para remover el exceso de las aletas de división. La ligación del andamio cubierto se hace usando T4 ligasa para incrementar la estabilidad de la estructura. Sólo un tipo de aleta se necesita por tinta fluorescente. Las aletas tienen una longitud de 95 ó 100 bases y tienen regiones complementarias a los parches, a los oligonucleótidos marcados y entre sí. Cada aleta tiene 15 secuencias de repetición de bases para unirse con oligonucleótidos marcados. Las secuencias de repetición se basan en secuencias Lambda que fueron analizadas para remover cualquier palíndromo y estructura de horquilla.

45 Las condiciones para fusión de las aletas son las siguientes. La secuencia en la aleta que corresponde al parche tiene un largo de 5 partes de bases de nucleótidos y, por ello, las aletas se fusionan específicamente con los parches incluso con altas concentraciones de sales. La relación de las aletas a los parches es de 2:1. A fin de incrementar la estabilidad a altas temperaturas, la ligación de los parches entre sí y la aleta a los parches se puede llevar a cabo en la misma reacción.

50 1) Cuantificar el andamio purificado usando un espectrómetro a A260nm. Calcular el volumen necesario para la cantidad apropiada de nanoindicador para preparar. Para este ejemplo, usamos 110 ng o 0,023 pmol, la lectura a A260 nm muestra 7,7 ng/ $\mu\text{l}$  o 14,3  $\mu\text{l}$  para 110 ng. 2) Configurar la reacción de ligación de la siguiente manera (el volumen variará, según la purificación y la escala). Actualmente usando 1,5X aletas con parches, calcular de forma concordante. Para este ejemplo, hay cuatro diferentes tintas fluorescentes (color) marcadas A, B, C y D y 8 diferentes posiciones o regiones en la que los ácidos nucleicos marcados con tinturas se pueden unir en un nanoindicador. La cantidad de posiciones para cada color (en este caso 1-4) multiplicar por 9, multiplicar por 1,5 moles de andamio =  
55 moles de aletas para usar.

Para el nanoindicador con tinta fluorescente en la secuencia/posiciones[ABABCBAD] :

ABABCBAD =

A:  $40.5 \times .023 = 0,93$  pmol; vol: 0,93  $\mu$ l de SF (aleta de division)-AL a 1  $\mu$ M

0,93  $\mu$ l de SF-AR a 1  $\mu$ M

B:  $40.5 \times .023 = 0,93$  pmol; vol: 0,93  $\mu$ l de SF-BL a 1  $\mu$ M

0,93  $\mu$ l de SF-BR a 1  $\mu$ M

5 C:  $13.5 \times .023 = 0,31$  pmol; vol: 0,31  $\mu$ l de SF-CL a 1  $\mu$ M

0,31  $\mu$ l de SF-CR a 1  $\mu$ M

D:  $13.5 \times .023 = 0,31$  pmol; vol: 0,31  $\mu$ l de SF-DL a 1  $\mu$ M

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

10 La reacción de ligación (25  $\mu$ l total) consiste en: aletas de división (ver con anterioridad; 4,96  $\mu$ l, o  $\sim$ 5  $\mu$ l total), 14,3  $\mu$ l de andamio MODB a 0,0016 pmol/ $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l 10X tampón de ligación T4, 2,2  $\mu$ l de NanoPure H2O y 1  $\mu$ l de T4 ligasa. Incubar los tubos 5 minutos a 45 °C. Mover a baño de agua de 37 °C, inc. durante 5 min. Añadir 1  $\mu$ l de T4 ligasa a las muestras, incubar durante 1 hora más a 37 °C. Congelar de inmediato o calentar a 75 °C durante 5 minutos para matar la T4 ligasa.

15 *Ligación de secuencias específicas de la diana con los nanoindicadores.* La séptima etapa incluye la ligación de una secuencia específica de la diana con el nanoindicador. Una secuencia específica de la diana de ADN se diseña para ser complementaria de la molécula diana, que puede ser ARN (por ejemplo, mARN) o ADN (por ejemplo, cADN o ADN genómico). La secuencia específica de la diana puede ser de 35,60 ó 70 bases de nucleótidos de largo. La secuencia específica de la diana se puede ligar con el andamio usando una región pendiente monocatenaria en el andamio cubierto. El andamio con un tipo simple de secuencia específica de la diana se puede fabricar por separado y luego  
20 mezclar para formar bibliotecas.

*Construcción de nanoindicadores.* La adición de oligonucleótidos a un nanoindicador se puede realizar en cualquier punto durante la construcción de un nanoindicador. En ciertos aspectos de la presente invención, un oligonucleótido marcado tiene un largo de 15 bases de nucleótidos. En el extremo 5', se adjunta una tinta de fluoróforo simple. Los oligonucleótidos con una tinta de fluoróforo particular tendrá en general la misma secuencia. Estos oligonucleótidos  
25 marcados se unen con las secuencias de repetición de las aleas de división. Los fluoróforos más apropiados para este ejemplo incluyen, pero sin limitación, Alexa 488, cy3, Alexa 594 y Alexa 647. El largo de 15 bases de nucleótidos mantiene a los fluoróforos suficientemente separados de modo que no se puedan neutralizar entre sí y que puedan asegurar que los ácidos nucleicos marcados serán estables (no fundirán la cadena complementaria) en condiciones en el proceso de visualización. Los oligonucleótidos marcados son estables a 40 °C. Esta longitud corta también permite  
30 empaquetar una gran cantidad de tintas fluorescentes en las aletas. En determinados aspectos de la invención, los oligonucleótidos marcados se introducen durante el procesamiento de las muestras diana.

*Unión de nanoindicadores con las moléculas diana.* Los nanoindicadores se pueden unir con las moléculas diana usando cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. En una realización de ejemplo, se hibridan los nanoindicadores duales en las moléculas diana mezclando 250 pmols de cada una de la primera sonda y la segunda  
35 sonda con 125 pmols de diana. El volumen total se ajusta a 4  $\mu$ l y una concentración final de tampón de 5X SSC. Esta mezcla se incuba en un tubo de PCR cubierto durante la noche a 42 grados para permitir que se produzca la hibridación.

*Unión con la superficie.* Una vez que los nanoindicadores se unen tanto con la molécula diana como con los correspondientes ácidos nucleicos marcados, es decir, ácidos nucleicos unidos con los monómeros marcados, se  
40 unen con una superficie y se estiran para resolver el orden de las señales emitidas por los monómeros de etiqueta y así identifican la molécula diana. En este ejemplo, los nanoindicadores se estiran para resolver espacialmente sus códigos de tinta fluorescente que corresponden a una molécula diana particular. Los nanoindicadores se estiran uniendo un extremo con una superficie (en este ejemplo — una tapa, ver las preparaciones de abajo). Dos métodos para la unión con la superficie se pueden usar: A) cubreobjetos recubiertos con estreptavidina de Accelr8 Corporation con los  
45 nanoindicadores biotinilados y B) cubreobjetos recubiertos con biotina con los nanoindicadores con estreptavidina. En el tampón, los nanoindicadores se ponen en contacto con la superficie activa y permiten la incubación durante un período de tiempo. La reacción se lleva a cabo en celdas de flujo que se prepararon de PDMS moldeado en deflectores de silicona grabados para preparar los canales. Se usaron tubos de metal para las cavidades centrales en los extremos de los canales para tampón e inserción de la muestra. Las dimensiones del canal son de 0,5 mm o 1 mm de  
50 ancho y 54  $\mu$ m de alto. Una vez cargada la muestra en el carril de la celda de flujo y de incubar, los nanoindicadores se deberían unir. Los nanoindicadores se pueden estirar ya sea por aplicación de un voltaje o por remoción del líquido con un menisco de retroceso que deja las cadenas estiradas y secas.

*Preparación de la superficie y ensamblado del dispositivo.* Las superficies de unión (Accelr8brand Streptavidin-OptiChem, cubreobjetos recubiertos) son enviadas en unidades de 5 superficies por contenedor de  
55 diapositiva y cada contenedor está envasado con un paquete de desecante de sílice en una bolsa de lámina. Estas

bolsas son almacenadas a -20 °C hasta el uso. Para preparar la superficie para la unión, una bolsa es retirada primero del congelador y se deja llegar a temperatura ambiente durante varios minutos. Si no se abre previamente, el pouch es cortado entonces a lo largo de un borde para formar un corte y se retiran las superficies del contenedor. Después de retirar la superficie requerida, el contenedor es reemplazado en la bolsa con su desecante, se cierra sellando el corte con una tira de cinta para envasar y se reemplaza la bolsa en el congelador.

La superficie es enjuagada entonces levemente con una corriente de agua Nanopure (Barnstead Nanopure Diamond) y embebida durante 10 minutos en 1X PBS 0,2 µm filtrado en un recipiente Coplin limpio, ranurado. Después del embebido la superficie se sumerge en agua Nanopure y se seca soplando nitrógeno filtrado a través del borde de superficie.

El dispositivo PDMS usado para adaptarse a la superficie y proporcionar la localización de la muestra se limpia justo antes del uso aplicando una cinta de celofán a la superficie de PDMS y luego quitando el polvo u otras partículas que pueden haberse adherido durante el almacenamiento. El lado de unión de la superficie Accelr8 es colocado mirando hacia arriba y la estructura de PDMS limpia es centrada, con el lado del canal hacia abajo, sobre la superficie. El PDMS se adhiere fácilmente al vidrio recubierto y no es necesario ningún otro mecanismo de unión.

*Unión de la muestra y lavado.* La muestra se une a la superficie aplicando primero una gota de cinco µL de la muestra (diluido actualmente en 100 mM de tampón de borato de sodio, pH 9,8) en una cavidad de la banda elegida. La gota debería tocar sólo el punto en el cual el canal se une a la cavidad (alguna de las muestras se puede absorber en el canal en este punto). El canal se llena, y se ecualiza la unión a través del canal, empujando la gota a través del canal a la cavidad opuesta usando un vacío muy débil (< 2 kPa). El proceso se repite para las otras muestras en sus bandas respectivas. Luego se retira el exceso de fluido de las cavidades, las cavidades se tapan con cinta para reducir la evaporación y el dispositivo es incubado a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos.

Después de la unión, la cinta es retirada y la cavidad superior de cada banda es llenada con 100 µL del tampón borato descrito más arriba. Aproximadamente 20 µL de ese tampón es empujado a través de los canales a las otras cavidades usando el vacío y el proceso se repite una vez. Todo el tampón borato es retirado luego de todas las cavidades y la cavidad superior se llena con 1X TAE, pH 8,3. Aproximadamente 50 µL de TAE se empujan a través del canal, luego todo el TAE es retirado y se vuelve a llenar la cavidad. El proceso se repite tres veces, para un total de aproximadamente 150 µL de enjuague TAE. Finalmente, todas las cavidades son llenadas con 100 µL de 1X TAE.

*Electroestiramiento.* El fondo del dispositivo de cubreobjetos/PDMS es rociado con aceite de inmersión y colocado en el microscopio. Se insertan electrodos en las cavidades en extremos opuestos del primer canal de PDMS (el electrodo negativo en la cavidad superior, el positivo en el fondo). La primera imagen del canal se tomará cerca de la cavidad del fondo; la plataforma del microscopio se ajusta de tal modo que el área de interés está enfocada. Se aplica luego el voltaje (200 V) a través del canal. El voltaje es aplicado por un suministro de energía de CA (Agilent E3630A) y amplificado 100X a través de un amplificador construido en el lugar. Después que se aplica la corriente, se reajusta el foco y comienza el proceso de toma de imágenes.

El electroestiramiento y el proceso de toma de imágenes se repite luego con el resto de los canales.

Se toma imágenes de las uniones.

*Fuente de luz para los colorantes fluorescentes en el nanoindicador.* Al usar una lámpara de arco como fuente de luz, la mejor selección de fluoróforo son los tipos más brillantes sin llevar a una superposición fluorescente tal como Alexa 488, Ci3 y Alexa 594. Colorantes fluorescentes más débiles, tales como asAlexa 647 y Ci5.5 también pueden ser usados.

*Filtros para tomar imágenes de los colorantes fluorescentes en el nanoindicador.* Para los fluoróforos seleccionados Alexa 488, Ci3, Alexa 594 y Alexa 647 puede haber una superposición entre teCi3 y Alexa 594. Sin embargo, un ordenamiento de un filtro de emisión con un ancho de banda de 572-600 nm minimiza la superposición.

*Microscopio y lente del objetivo para tomar imágenes de los nanoindicadores.* El modelo de microscopio usado era el Nikon Eclipse TE2000E de Nikon Incorporation usando la estación de toma de imágenes de fluorescencia invertidas que tiene 6 cassettes de filtro que permiten la selección de la emisión fluorescente de múltiples candidatos de colorante fluorescente. Para los colorantes seleccionados, la resolución óptica requerida es de aproximadamente 400 nm para todas las longitudes de onda (500-700 nm). La lente del objetivo seleccionada es la lente Nikon Plan Apo TIRF que tiene un NA de 1,45 y una ampliación de 60. La resolución óptica es —210-300 nm para diferentes longitudes de onda.

## 6.2 Ejemplo 2: protocolo de preparación de un nanoindicador de conexión/aleta

Este ejemplo demuestra otra manera de preparar un nanoindicador que consiste en un ADN viral M13mp18 lineal de una sola hebra, unidades de parche de oligonucleótidos y aletas largas. Las unidades de etiqueta del nanoindicador fueron generadas exitosamente usando métodos substancialmente como se describen en este ejemplo. Las unidades de parche pre-fosforiladas y las aletas son agregadas junto con el vector de ADN M13mp18 y ligadas juntas. Después de la ligación de las aletas a las unidades de parche, que son ligadas al ADN M13mp18, se introduce la enzima BamHI

## ES 2 620 398 T3

para linealizar el vector. Preparar un lote de nanoindicadores comenzando con 5 pg de M13mp18 como un andamio. La hibridación puede ser aumentada de acuerdo con la cantidad deseada. Este proceso tomará aproximadamente 1-2 días para completarse.

Materiales:

Qti	Ítem	Vendedor
20	250 ug/ul ssADN viral M13mp18	New England Biolabs
27 ul	0,74 pmoles/ul de una mezcla de oligonucleótido unidad de parche	IDT
8 ul	Oligonucleótido de aleta larga A 100 pmol/ul	IDT
8 ul	Oligonucleótido de aleta larga B 100 pmol/ul	IDT
0,5 ul	Oligos de conexión aletas a 100 pmol/ul de placas #529916 y #610591	IDT
31 ul	T4 Ligasa 10 x tampón	Fermentas
19 ul	T4 Ligasa	Fermentas
15 ul	Optikinasa 10 x tampón	USB
4.2 ul	100 mM ATP	ANY
5 ul	Enzima optikinasa 10 unidades/ul	USB
1 ul	BamHI oligonucleótido 10 pmol/ul	IDT
20 ul	BamHI 10 x tampón	Fermentas
3 ul	Enzima BamHI 10 unidades/ul	Fermentas

5

Precalentar agua a 37 °C y 55 °C antes de comenzar con el protocolo. Asegurarse de que los tampones estén todos bien mezclados y descongelados antes de usar. Una placa de trabajo debería estar disponible y marcada con los oligos ordenados de IDT en las placas #529916 y #610591. Tomar estas dos placas y descongelar a temperatura ambiente durante 0,5-1 horas y centrifugar el contenido antes de mover la cinta que cubre las cavidades. Se realizarán cuatro reacciones separadas en tubos de Eppendorf de 1,5 ml usando oligonucleótidos específicos de estas placas. Comenzar a marcar estos cuatro tubos separados con números romanos en sus tapas. Las columnas 5 y 6 A a H son para la reacción I, las Columnas 7 y 8 A a H son para la reacción ii, todas se encuentran en la placa #529916. Las Columnas 1 y 2 son para la reacción iv y las Columnas 3 y 4 son para la reacción iii.

10

*Ligaciones de las aletas (Etapa A):* Marcar cuatro tubos separados de 1,5 ml con los números romanos i a iv (mencionados más arriba). Agregar los reactivos indicados más abajo correspondientemente a cada 50 µl de reacción que contiene: 5 µl de 10x tampón ligasa, 0,5 pl/oligonucleótido de las cavidades designadas de las placas #529916 y #610591, 4 µl Oligo aleta larga/reacción (A o B) para las reacciones I, ii y iv; 3 ul de LF para el área iii, 29 H2O para las reacciones I, ii y iv; 32 µl H2O para la reacción iii y 4 µl de T4 ligasa. Preasociar los oligos en esta mezcla sin la ligasa a 37 °C durante media hora. Agregar la ligasa como último reactivo y permitir ligar a temperatura ambiente durante al menos cuatro horas. La concentración del producto es de 1 pmol/aleta/pl.

15

20

*Fosforilación de la ligación de la aleta (Etapa B):* Marcar cuatro tubos separados de 1,5 ml con números romanos nuevamente, uno a cuatro con una P adentro de un círculo para designar que los productos son fosforilados. Agregar los reactivos siguientes al tubo correspondiente: 10 µl/ligación de aleta, reacción (tomar 10 µl/de la reacción de ligación de aleta mencionada más arriba), 2,5 µl de tampón Optikinasa, 0,5 µl de 100 mM ATP, 11,5 µl de H2O y 0,5 µl de

enzima Optikinasa. Incubar a 37 °C durante 1 hora. Concentración del producto 0,4 pmoles/aleta/pl.

*Fosforilación de la unidad de parche de oligonucleótido (Etapa C):* 27 µl de una mezcla de unidad de parche oligonucleótido 0,74 pmoles/pl, 5 µl de tampón 1 Ox, 1 µl de 100 mM ATP, 3 µl de enzima Optikinasa y 14 µl de H<sub>2</sub>O. Una vez que los reactivos están todos juntos mezclar suavemente la solución moviendo el tubo algunas veces y centrifugar. Incubar a 37 °C durante 1 hora.

5

*Hibridación al andamio de M13mp18 (Etapa D):* En un nuevo tubo de 1,5 ml agregar los siguientes reactivos: 20 µl de M13mp18 a 250 ng/µl, 27 µl de unidades de parche de oligonucleótidos fosforiladas 0,4 pmoles/µl (Etapa C), 12,5 µl/ligación de aleta fosforilada (Etapa B) precalentar a 55 °C durante 5 minutos y colocar sobre hielo, 11 µl de tampón 1 Ox ligasa y calentar toda la mezcla a 55 °C durante 1 minuto. Hibridar la mezcla a 37 °C durante al menos 4 horas.

10 *Ligación (Etapa E):* Centrifugar el contenido del Eppendorf. Agregar 1,2 µl de 100 mM ATP y 3 µl de T4 ligasa. Mezclar suavemente el contenido moviendo el tubo, luego centrifugar.

*Digestión con BamHI (Etapa F):* 1 µl de 10 pmoles de BamHI oligo, 20 µl de tampón 10 x BamHI y hibridar a 37 °C durante 1 hora. Ajustar el volumen a 200 µl. Agregar 3 µl de enzima BamHI. Incubar a 37 °C durante 1 hora.

15 Primera etapa: comenzar agregando 20 µl de M13mp18 (NEB 250 pg/ml) a un tubo de Eppendorf limpio de 1,7 ml. Tomar 5 µl de reacción de ligación de aleta fosforilada y precalentarla a 70 durante 2 minutos y colocar inmediatamente sobre hielo. Agregar los 5 µl de cada reacción de ligación de aleta fosforilada (1 pmol/aleta/µl) al tubo y mezclar suavemente pipeteando algunas veces. Incubar el tubo de Eppendorf a 37 °C durante 1 hora.

20 Segunda etapa: colocar 13,5 µl de la mezcla de unidad de parche de oligonucleótido (0,74 pmoles/µl) y 1 µl de Acridite Mix (10 pmoles/pl) en un nuevo tubo de Eppendorf de 1,7 ml. Agregar 5 µl de 10 x tampón Optikinasa, 1 µl de 100 mM ATP y 27,5 µl de H<sub>2</sub>O. Mezclar suavemente pipeteando la solución. Agregar 2 µl de enzima Optikinasa, mezclar suavemente pipeteando e incubar a 37 °C durante 1 hora.

Tercera etapa: tomar los oligos fosforilados rxn y agregarlos enteramente al contenido de la hibridación de M13mp18+aletas. La reacción se mezcla suavemente pipeteando y se deja incubar a 30 °C durante 1 hora. Después de la completar la hibridación ajustar el ATP agregando 1 µl (100 ATP) a la reacción.

25 Cuarta etapa: centrifugar el contenido del tubo de Eppendorf y agregar 4 µl de T4 enzima Ligasa (5 unidades/µl), mezclar suavemente pipeteando. Incubar a temperatura ambiente durante al menos cuatro horas. Agregar 1 µl de oligonucleótido BamHI (10 pmoles/µl) para hibridar a temperatura ambiente mientras tiene lugar la ligación.

30 Quinta etapa: digerir la reacción de ligación agregando 4 µl de enzima BamHI (5 unidades/µl), mezclar suavemente pipeteando e incubar a 37 °C durante 1 hora. Una vez que terminó el período de incubación, tomar una alícuota de 500 ng para QC.

Sexta etapa: tratar con Psoralen, UV o luz DMPA durante 15 minutos.

Los cálculos incluyen:

5 pg de MI 3 = 20 µl stock de New England Biolabs = 2 pmol de mezcla de oligonucleótido: 180-34 áreas de aletas — 10 Oligos modificados con Acridite = 0,74 pmoles/oligo

35 10 pmoles/oligonucleótido = 13,5 µl = 1350 pmoles

Optikinasa 1 unidad convierte 1 nmol de fosfato a exceso de uso final. Se usaron 4 µl de Optikinasa.

### 6.3 Ejemplo 3: protocolo para la producción de nanoindicadores de ARN

40 Se generaron y se emplearon exitosamente nanoindicadores para detectar moléculas diana usando métodos substancialmente como se describe en este ejemplo. Un ejemplo de detección de la diana usando este método se muestra en la Figura 6.

45 *Producción del andamio.* AND M13mp18 circular de hebra simple (USB) fue reasociado con un exceso 5 veces molar de un oligonucleótido complementario al sitio de reconocimiento de BamHI (oligo cortador Bam) y cortado con la enzima de restricción BamHI para dar un esqueleto de ADN lineal de hebra simple. Un oligonucleótido complementario al oligonucleótido cortador Bam (oligonucleótido anti-Bam) fue agregado subsiguientemente en un exceso de 50 veces para secuestrar oligonucleótido cortador Bam libre y evitar así la recircularización del MI3 durante etapas posteriores. La molécula lineal de MI3 sirve como un andamio sobre el cual se pueden reasociar conexiones de ARN o segmentos de ARN, con fluoróforos incorporados.

50 *PCR para formar posiciones de doble hebra sobre el andamio MI3.* Se diseñaron diez conjuntos de pares de cebadores de oligonucleótidos para crear 10 diferentes regiones a lo largo del andamio MI3. Cada par contiene un cebador que tiene un promotor T7 ARN polimerasa en el extremo 5'. Las regiones 2-7 son diseñadas para tener 900 bases (aproximadamente 300 nm) de largo, ya que éste es el tamaño aproximado de una mancha limitada por difracción (la

mancha más pequeña que se puede lograr con óptica estándar). Las regiones 1 y 8 tienen ambas versiones larga y corta: las versiones largas cubren toda la región de 900 bases, mientras que las versiones cortas cubren sólo una parte de la región de 900 bases para permitir que una secuencia específica de la diana sea ligada. Por lo tanto una secuencia específica de la diana puede ser unida a cualquiera de los extremos. Los extremos también se pueden usar para la unión a anclas o etiquetas.

Se realiza una PCR usando Taq polimerasa y 0,5 ng de dM13mp18 de doble hebra (USB) como molde. Las reacciones se limpian usando un kit de purificación Qiaquick de Qiagen. Cada reacción de PCR da un fragmento de doble hebra correspondiente a un segmento específico como se ilustra más abajo. Estos fragmentos se usan como moldes para la transcripción *in vitro* de los segmentos de ARN.

10 *Transcripción in vitro para producir segmentos de ARN oscuros.* Usando los productos de PCR descritos más arriba como moldes de doble hebra, se generan segmentos de ARN usando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion (Megascript T7 kit). Los productos de las reacciones de transcripción son purificados (incluyendo el tratamiento con ADNsa 1 para remover el molde) usando un RNeasyKit de Qiagen.

15 *Transcripción in vitro para producir segmentos de ARN modificados con grupos aminoalilo.* Usando los productos de PCR descritos más arriba como moldes de doble hebra, se generan segmentos de ARN para un acoplamiento de colorante posterior usando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion (MessageAmp aRNA kit). Nucleótidos UTP modificados con aminoalilo son incorporados en los segmentos de ARN durante la transcripción. Los productos de las reacciones de transcripción son purificados (incluyendo tratamiento con ADNsa I para remover el molde) usando un RNeasy Kit de Qiagen.

20 *Acoplamiento de colorante de segmentos de ARN de aminoalilo para producir segmentos de ARN coloreados.* 20-100 pg de un segmento de ARN modificado con aminoalilo es acoplado con colorantes de NHS-éster usando el kit de Ambion Aminoallyl Labeling Kit. Los colorantes usados incluyen Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647 (Invitrogen/Molecular Probes) así como también Ci3 (Amersham).

25 Cada segmento está hecho separadamente en cuatro colores de tal modo que cada posición en el andamio puede ser llenada con un segmento en cualquiera de los cuatro colores; así diferentes colores pueden ser fijados en diferentes posiciones para crear muchas combinaciones de color únicas.

En esta realización particular, los segmentos adyacentes tienen que ser de diferentes colores o puede haber segmentos oscuros intercalados de tal modo que cada segmento es detectado como una 'mancha' individual. Los segmentos oscuros pueden ser usados como parte del código de nanoindicador.

30 *Ensamblado de la molécula etiqueta.* Segmentos para cada posición son reasociados en una relación 2:1 del segmento al andamio M13 en tampón IX SSPE a 70 °C durante 2 horas. Un nanoindicador ensamblado con segmentos de ARN marcados se ilustra en las Figuras 3A y 3B. La Figura 3A ilustra un nanoindicador en el cual sólo "manchas" alternadas (1, 3, 5 y 7) están marcadas y la Figura 3B ilustra un nanoindicador en el cual cada mancha está marcada.

35 6.4 Ejemplo 4: detección de ARN diana (S2) Y ADN

Moléculas que usan una combinación de nanoindicador de ARN/sonda fantasma

40 *Síntesis de oligonucleótidos de sonda y de diana.* Un oligonucleótido diana S2 ADN fue sintetizado y purificado por electroforesis de gel poliacrilamida (Integrated DNA Technologies). Las moléculas de S2 ARN fueron generadas mediante transcripción *in vitro* de productos de PCR correspondientes a una región del gen de coronavirus SARS clonado (Invitrogen) para lo cual se utilizó un kit Megascript™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda fantasma S2 (Figura 6A (i) era complementaria con respecto a una región específica de 50 bases de la secuencia de la diana de S2 (S2-a) y fue sintetizada con un monómero biotina-TEG en el extremo 5' y purificada mediante HPLC (high performance liquid chromatography, cromatografía líquida de alto rendimiento) (Integrated DNA Technologies). Un segundo oligonucleótido con 50 bps complementaria con respecto a la diana S2 (S2-b) más 9 bp de una secuencia adicional utilizada para la ligación al andamio M13 (total: (59bp) fue sintetizado y purificado mediante HPLC (Integrated DNA Technologies). Obsérvese que las regiones diana S2-a y S2-b no se superponían.

50 *Síntesis del nanoindicador.* El oligonucleótido S2-b fue ligado al extremo 5' de M13 linealizado [Figura 6A (iii)], y el producto fue purificado del oligonucleótido residual no ligado mediante filtración de exclusión de tamaño a través de un filtro YM100 (Millipore) siguiéndose las instrucciones del fabricante. Se generaron segmentos de ARN amino-allil modificados complementarios con respecto a M13 en las posiciones 2, 4, 6, y 8 (Figura 1C) a partir de la transcripción *in vitro* de plantillas de ADN (productos de PCR) por medio del kit Ambion Megascript™ siguiéndose las instrucciones del fabricante. Los segmentos fueron seguidamente acoplados al tinte Alexa 647 modificado por N-éster (Invitrogen) siguiéndose las instrucciones de Ambion (kit amino allil MessageAmp™ II aRNA). Los segmentos de ARN correspondientes a las posiciones 1, 3, 5, y 7 del andamio M13 (Figura 1C) fueron generados como ARNs no modificados transcritos *in vitro* a partir de plantillas de ADN como se describe en lo que precede. El ensamble del nanoindicador se llevó a cabo fusionando 10 fmol/pl de cada uno de los ocho segmentos a 5 fmol/μl del andamio M13-S1-6 durante dos horas a 70 °C en tampón 1X SSPE (150 mM cloruro de sodio, 10 mM fosfato de sodio, 1 mM

EDTA). El producto final fue un nanoindicador con 4 segmentos etiquetados con A647 (rojo) interdispersado con segmentos oscuros.

*Condiciones de hibridación.* La hibridación de los nanoindicadores y de las sondas fantasma a la diana se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 5X SSPE (750 mM cloruro de sodio, 50 mM fosfato de sodio, 5 mM EDTA disódico), 40  $\mu$ M de sonda fantasma (oligonucleótido de fijación S2-a), 40  $\mu$ M nanoindicador S2-b, 100 ng/pl de ADN esperma de salmón cizallado, 5X de solución de Denhardt y Tween al 0,1%. Las concentraciones finales de la diana fueron 20  $\mu$ M S2 ADN (Figura 6B) y 1  $\mu$ M S2 ARN diana (Figura 6C). No se añadió ninguna diana al control negativo (Figura 6C). La reacción de hibridación se incubó a 65° C durante por lo menos 16 h.

Las reacciones de hibridación fueron diluidas 1:2 con 100 mM solución tampón borato e Introducidas en un canal de celda de flujo y se ligó a una tapa recubierta con estreptavidina que formaba el fondo del canal (tapas de Streptavidin-OptiChem de Accelr8). La fijación al cubreobjetos en uno de los extremos del complejo: nanoindicador/diana/sonda fantasma se llevó a cabo mediante la interacción de la sonda fantasma biotinilada con la superficie de estreptavidina. Después de enjuagar el canal con tampón borato adicional a efecto de remover los reporteros en exceso no ligados a la superficie, se intercambié el tampón con 1X TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y se aplicó una corriente eléctrica de 200 V para estirar los complejos nanoindicador/diana durante la captura de las imágenes.

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Leica DMI 6000B con un objetivo de inmersión en aceite 63X (1,4 NA), fuente de luz Xeite-120 e (Exfo), juego de filtros a medida (Chroma Technologies), una cámara Orca-ER CCD (Hamamatsu) y software de adquisición de datos Metamorph (Molecular Devices). Como se predijo, cuando la molécula diana S2 correcta se hibrida [Figura 6A (ii)] tanto a la sonda fantasma [Figura 6A (i), S2-a] como al nanoindicador específico para diana S2-b [Figura 6A (iii)], el complejo sonda fantasma/diana/nanoindicador forma una especie individual que se fija al cubreobjetos y fue visualizado como 4 manchas cuando se expuso a una luz de una longitud de onda de 647 nm (Figuras 6B, 6C, y 6E). La amplitud de la ligación dependía de la concentración de la diana. No hubo una ligación significativa en ausencia de la secuencia diana S2 (Figura 6D).

#### 6.5 Ejemplo 5: nanoindicador que comprende un fragmento de anticuerpo monovalente

Cuando una molécula diana es una proteína o polipéptido, es posible generar un nanoindicador en el que el andamio de nanoindicador es un ácido nucleico y la secuencia específica de la diana es un fragmento de anticuerpo monovalente. Mediante la utilización de métodos rutinarios, un anticuerpo que reconoce una molécula diana de interés es opcionalmente digerido con pepsina para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Las dos partes del anticuerpo o los dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> generados mediante la digestión por pepsina son separadas mediante una reducción suave, por ejemplo con 2-mercaptoetilamina. Esta reducción separa sea el anticuerpo o los dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> en dos fragmentos monovalentes con dos grupos sulfhidrilo que pueden ser funcionalizados.

Se utiliza un reactivo de reticulación heterobifuncional (por ejemplo, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster de Pierce Biotechnology Inc.) para fijar la maleimida a un oligonucleótido con una modificación amina (que puede obtenerse de muchas fuentes tales como Integrated DNA Technologies). El NHS en el reactivo de reticulación se hace reaccionar con la amina situado sobre los oligonucleótidos para producir un oligonucleótido conjugado con maleimida.

Este oligonucleótido conjugado con maleimida se hace seguidamente reaccionar con uno de los grupos sulfhidrilo del fragmento del anticuerpo. Debido a limitaciones estéricas, es preferente que un solo oligonucleótido sea fijado a cada fragmento. Este fragmento de anticuerpo monovalente fijado a un oligonucleótido puede ser seguidamente hibridado a una secuencia complementaria en un andamio de nanoindicador, para generar un nanoindicador en el que la secuencia específica es una secuencia de anticuerpo.

*Fijación a la superficie.* Una vez que los nanoindicadores estén fijados tanto a la molécula diana como a los correspondientes ácidos nucleicos etiquetados, es decir los ácidos nucleicos fijados a monómeros de etiqueta, se los fija a una superficie y se los estira para resolver el orden de las señales emitidas por los monómeros de etiqueta y por lo tanto identificar la molécula diana. En este ejemplo, los nanoindicadores son estirados para resolver espacialmente sus códigos de tinta fluorescente que corresponden a una molécula diana en particular. Los nanoindicadores son estirados fijando uno de sus extremos a una superficie (en este ejemplo, una tapa, ver preparaciones más abajo). Pueden utilizarse dos métodos para la fijación a una superficie: A) unos cubreobjetos recubiertos con estreptavidina de Accelr8 Corporation, biotinilándose los nanoindicadores; y B) cubreobjetos recubiertos con biotina, en donde los nanoindicadores tienen estreptavidina. En tampón, los nanoindicadores son puestos en contacto con la superficie activa, y se les permite incubarse durante un período de tiempo. La reacción se lleva a cabo en células de flujo hechos de PDMS moldeados en forma de casetonados de silicona tratados con mordiente para preparar los canales. Se utiliza una tubería metálica para cavidades núcleo en los extremos de los canales para la inserción de tampón y muestra. Las dimensiones de los canales son de 0,5 mm de 1 mm de anchos y con una altura de 54  $\mu$ m. Una vez que las muestras han sido introducidas en la pista de la célula de flujo, deberían fijarse los nanoindicadores. Los nanoindicadores pueden estirarse sea aplicando un voltaje o removiendo el líquido con un menisco entrante que deja las cadenas estiradas y secas.

*Preparación de la superficie y ensamble del dispositivo.* Las superficies de ligación (Accelr8 brand Streptavidin-OptiChem, coverslips recubiertos) son enviados en unidades de 5 superficies por contenedor de slide, y cada contenedor está encerrado dentro de un empaque de desecante sílice en una bolsita de foil. Las bolsitas se guardan a -20 °C hasta su utilización.

5 Para preparar la superficie para la ligación, se empieza por extraer una bolsita desde el congelador y se le permite llegar a la temperatura ambiente a lo largo de varios minutos. Si no ha sido previamente abierta, la bolsita es seguidamente deslizada a lo largo de uno de sus bordes de manera de formar una hendidura, y se retira el contenedor de superficies. Al retirarse la superficie requerida, se vuelve a colocar el contenedor en la bolsita con su desecante, se cierra la hendidura sellándolo con un tira de cinta de embalaje, y se vuelve a colocar la bolsita en el contenedor.}

10 A continuación se enjuaga la superficie ligeramente con una corriente de agua Nanopure (Bamstead Nanopure Diamond) y se empapa durante 10 minutos en 1X PBS filtrado 0,2 µm en un jarro Coplin rasurado limpio. Después de la imbibición, se sumerge la superficie en agua Nanopure y se la seca soplando nitrógeno filtrado a través del borde de la superficie.

15 El dispositivo PDMS utilizado para hacer juego con la superficie y proveer la localización de la muestra se limpian justo antes de su utilización mediante la aplicación de cinta de celofán sobre la superficie de PDMS y a continuación se retira el polvo u otras partículas que pueden haberse fijado durante el almacenamiento. El lado de ligación de la superficie de Accelr8 se colocada cara arriba, y se centra la estructura de PDMS limpia, lado canal hacia abajo, sobre la superficie. El PDMS se adhiere fácilmente al vidrio y no se necesita ningún mecanismo de fijación adicional.

20 *Ligación y lavado de muestras.* Se liga la muestra a la superficie empezando por aplicar una gota de 5 µl de la muestra (actualmente diluida en 100 mM tampón borato de sodio, pH 9.8) en una cavidad de la vía elegida. La gota debería tocar justo el punto en el que el canal se empalma con la cavidad (en este momento, parte de la muestra puede penetrar en el canal). Se llena el canal, y se equilibra la ligación a través del canal, para lo cual se empuja la gotita a través del canal hacia la cavidad opuesta para lo cual se utiliza un vacío muy débil (< 2 kPa). Se repite el proceso para las otras muestras en sus respectivas pistas. A continuación se remueve el fluido en exceso de las cavidades, se encantan las cavidades para reducir la evaporación, y se somete el dispositivo a incubación en la oscuridad durante 20 minutos.

25 Después de la ligación, se remueve la cinta, y la cantidad superior de cada pista se llena con 100 µl del tampón bátrato arriba descrito. Aproximadamente 20 µl de dicho tampón se llevados a través de los canales hacia las otras cavidades para lo cual se utiliza el vacío, y el proceso se repite una vez. A continuación se remueve la totalidad del tampón borato de todas las cavidades, y se llena la cavidad superior con 1X TAE, pH 8,3. Aproximadamente 50 µl son llevados a través del canal, y a continuación se retira la totalidad del TAE y se vuelve a llenar la cavidad. El proceso se repite tres veces, con un total de aproximadamente 150 µl de enjuague con TAE. Finalmente, todas las cavidades se llenan con 100 µl de IX TAE.

30 *Electroestiramiento.* Se mancha el fondo del dispositivo de tapa/PDMS con aceite de inmersión y se coloca en el microscopio. Se insertan los electrodos en las cavidades en extremos opuestos del primer canal de PDMS (electrodo negativo en la cavidad superior, electrodo positivo en el fondo), La primera imagen del canal será tomada cerca de la cavidad del fondo; se ajusta la etapa del microscopio de manera tal que el área de interés se encuentre en foco.

35 A continuación se aplica un voltaje (200 V) a través del canal. El voltaje es suministrado por una fuente de energía eléctrica de corriente continua (Agilent E3630A) y amplificado 100X mediante un amplificador de elevado voltaje (Matsusada Precision Inc.). Después de haberse aplicado una corriente, se reajusta el foco, y empieza el proceso de la formación de imágenes.

40 A continuación se repite el proceso de electroestiramiento y formación de imagen con los canales restantes. Formar imagen de los nanoindicadores.

45 *Fuente de luz para las tintas fluorescentes en el nanoindicador.* Al utilizarse una lámpara de arco como fuente de luz, la mejor selección de fluoróforo son los tipos más brillantes sin llegar a una superposición fluorescente tal como Alexa 488, Cy3, y Alexa 594. También pueden utilizarse tintes fluorescentes más débiles tales como Alexa 647 y Cy5.5.

50 *Filtros para imagen de los tintes fluorescentes en el nanoindicador.* Para los fluoróforos seleccionados Alexa 488, Cy3, Alexa 594 y Alexa 647 puede haber una superposición entre Cy3 y Alexa 594. Sin embargo, el ordenamiento a pedido de un filtro de emisión con un ancho de banda de 572- 600 nm minimiza la superposición.

55 *Microscopio y objetivo para formar imágenes de los nanoindicadores.* El modelo del microscopio utilizado es del Nikon Eclipse TE2000E de Nikon Incorporation que utiliza la estación de formación de imágenes por fluorescencia invertida que tiene 6 casetes de filtro que permiten la selección de la emisión fluorescente desde múltiples candidatos de tinta fluorescente. Para los tintes seleccionados, la resolución óptica requerida es de aproximadamente 400 nm para la totalidad de las longitudes de onda (500-700 nm). El objetivo seleccionado para el lente es el lente Nikon Plan Apo TIRE que tiene un NA de 1,45 y una amplificación de 60. La resolución óptica es de aproximadamente 210-300 para diferentes longitudes de onda.

5 Cinco minutos antes de utilizar el microscopio (Nikon Eclipse TE2000E), encender la fuente de luz (X-cite 120, Exfo Corporation) y asegurarse que la intensidad es la máxima. Encender el driver de la cámara CCD (Hamamatsu, Orca Ag) y el controlador del obturador. Utilizar el objetivo de aceite 60 x 1,45 NA (Plan Apo TIRF, Nikon) para evaluar los nanoindicadores. Para todas las evaluaciones de nanoindicadores se ajusta el optivar en 1x. Abrir el software Metamorph (Universal Imaging Corporation). Adquirir las imágenes utilizando los conjuntos de filtro correspondientes tales como cy3, A647 (Chroma Technologies).

#### 7. Referencias mencionadas

10 La presente invención puede implementarse como un producto programa de ordenador que comprende un mecanismo de programa de ordenador embebido en un medio de memoria legible por ordenador. Por ejemplo, el producto programa de ordenador podría contener los módulos de programa mostrados en la Figura 9. Estos módulos de programa pueden almacenarse en un CD-ROM, DVD, producto de memoria en disco magnético, o cualquier otro producto de memoria de datos o de programa legible por máquina. Los módulos de programa también pueden estar embebidos en una memoria permanente, tal como ROM, uno o más chips programables, o uno o más circuitos integrados de aplicación específica (ASICs). Dicha memoria permanente puede estar localizada en un servidor, punto de acceso 802.11, puente/estación inalámbrico de 802.11, repetidor, router, teléfono móvil, u otros dispositivos electrónicos. Los módulos de programa en el producto programa de ordenador también pueden estar distribuidos electrónicamente, por intermedio de Internet o de alguna manera, mediante la transmisión de una señal de datos de ordenador (en donde los módulos de software están embebidos) sea digitalmente sea sobre una onda portadora.

20 Muchas modificaciones y variaciones de esta invención pueden efectuarse, como será evidente para las personas expertas en la especialidad. Por ejemplo, el módulo de almacenamiento de datos 44, el módulo de Identificación de etiquetas 50, y el módulo de identificación de sondas 54 pueden combinarse en un único programa, pueden ser cada uno de ellos un programa por separado o podrían de hecho estar dispersos en múltiples programas (por ejemplo, tres o más). Las realizaciones específicas descritas en la presente se ofrecen a título de ejemplo solamente, y la invención ha de limitarse a solamente lo enunciado en la reivindicaciones adjuntas.

#### 25 **Listado de secuencias**

<110> Nanostring Technologies, Inc.

<120> SISTEMAS Y MÉTODOS PARA ANALIZAR NANOINDICADORES

<130> EP63168FZpau

<140> EP 07 795 152.3

30 <141> 2007-05-21

<150> PCT/US2007/012130

<151> 2007-05-21

<150> US 60/802,862

<151> 2006-05-22

35 <160> 3

<170> FastSEQ PARA windows Version 4.0

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región de unión de etiqueta sintética

<400> 1

ES 2 620 398 T3

```

gagctcggga gatggcgagc tggaagcatc agaaagtagg aagatgacaa aatagggcca 60
tagaagcatg aagaactgaa cgcatgagac aataggaagc tacgccacta gggacctgag 120
aagctgagcg gctcagcggg tccgagcgtc aaaaaataaa agagtgaac aatagacgaa 180
tgacgcggtg aaaccatcca gaagtaaacg ggtacaaaca tacagagata gccacctgga 240
ccaataggca cgtacaaacg tacaagcctg gcgcatgag gcaatccaca cgtgcagagc 300
tggaacaatg gaaagatgca agaataaacc gataccggga tcgagggtc agcgaataaa 360
gcagtcaaca actggaaaga tccacacata ccggcgtaac cgagtccaaa catacagacc 420
tgcaagactc gcgacatggg acggtaaaac catccgaccg taaaccggtg accaggtagc 480
cgggtaaaaa catagcaggg tggagacctc agaacgtaaa gacgtccaag ggtcgcggga 540
tagcgaacta cgcgcatcgc ccaatgggccc aatcaacaga taaacgagta gaaaagtcag 600
aaaaataagaa actaacgaaa tacgagggtc caaggatgca agactgaggc cctaaggaga 660
taaggaataa ggccgatgca gacctgaaac gatgcaccga tccgacggta aaagactaga 720
cacgtagccg gatcagggcc tgggaggctg gaaccgtgag cacatagcaa agtcgcagcg 780
tcggcagatg cgccggtaaa aaagtagagg catgaccgga tgggcaaata gcgacgtaca 840
gcagtgaagc actaaaagca tccaagggtg ggagactagg cgcctcgacg ggtaggtacc 900

```

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia terminal

<400> 2

gtctatcatc acagcgtcta tcatcacagc gtctatcatc acagcgtcta tcatcacagc 60

10 <210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Agente de inmovilización

<400> 3

gctgtgatga tagac 15

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para detectar la presencia de una sonda dentro de una muestra superpuesta sobre un sustrato, en donde la sonda comprende una pluralidad de etiquetas dispuestas espacialmente, en donde una primera etiqueta en la pluralidad de etiquetas se asocia con una primera posición sobre el sustrato que emite luz en un primer intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda, y una segunda etiqueta en la pluralidad de etiquetas se asocia con una segunda posición sobre el sustrato que emite luz en un segundo intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda, donde el método comprende:
- 10 identificar una pluralidad de etiquetas, en una pluralidad de imágenes de luz, que están próximas entre sí sobre el sustrato, en donde un orden espacial de la pluralidad de etiquetas determina una secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas, en donde cada imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz es para luz recibida de la muestra en un intervalo de longitud de onda en una pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda; y
- determinar si la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas comprende una secuencia indicadora válida, en donde
- 15 cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas se confirma como una secuencia indicadora válida, la pluralidad de etiquetas se considera que es la sonda; y
- cuando la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas no se confirma como una secuencia indicadora válida, la pluralidad de etiquetas se considera que no es la sonda.
- 20 2. Un producto de programa informático, en donde el producto de programa informático comprende un medio de almacenamiento legible por ordenador y un mecanismo de programa informático incluido dentro, el mecanismo de programa informático adaptado para realizar un método para detectar la presencia de una sonda dentro de una muestra superpuesta sobre un sustrato según la reivindicación 1,
- en donde el mecanismo de programa informático comprende:
- un módulo de almacenamiento de datos que comprende instrucciones para almacenar la pluralidad de imágenes de luz;
- 25 un módulo de identificación de etiquetas que comprende instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas; y
- un módulo de identificación de sondas que comprende instrucciones para determinar si la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas comprende la secuencia indicadora válida.
- 30 3. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde cada etiqueta en la pluralidad de etiquetas se asocia con una posición sobre el sustrato que emite más de una cantidad umbral de luz en al menos una imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz.
4. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde el mecanismo de programa informático también comprende una tabla de búsqueda que comprende una pluralidad de secuencias indicadoras válidas y en donde el módulo de identificación de sondas también comprende instrucciones para comparar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas con las secuencias indicadoras válidas en la tabla de búsqueda.
- 35 5. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde el módulo de almacenamiento de datos también comprende instrucciones para alinear una primera imagen de luz con una segunda imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz usando una pluralidad de fiduciarios presentes sobre el sustrato.
- 40 6. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde el módulo de identificación de etiquetas también comprende instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas candidatas en la pluralidad de imágenes de luz, y en donde dicha pluralidad de etiquetas es un subgrupo de la pluralidad de etiquetas candidatas que fueron validadas por el módulo de identificación de etiquetas.
7. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde una pluralidad de etiquetas candidatas se identifican por aplicación de un algoritmo de segmentación a cada una de la pluralidad de imágenes de luz.
- 45 8. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde el módulo de identificación de etiquetas también comprende:
- instrucciones para identificar una primera etiqueta candidata en la pluralidad de imágenes de luz; e
- instrucciones para identificar una segunda etiqueta candidata en la pluralidad de imágenes de luz que está dentro de una distancia predeterminada de la primera etiqueta candidata;
- en donde la pluralidad de etiquetas comprende la primera etiqueta candidata y la segunda etiqueta candidata.
- 50 9. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde la pluralidad de diferentes intervalos de

longitud de onda consiste en entre dos y quince diferentes intervalos de longitud de onda.

10. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde la pluralidad de etiquetas comprende cuatro etiquetas.

5 11. El producto de programa informático según la reivindicación 2, en donde un primer subgrupo de las etiquetas en la secuencia de cadenas realiza una comprobación de error de una identidad de las etiquetas en un segundo subgrupo de las etiquetas en la secuencia de cadena.

10 12. Un sistema informático para detectar la presencia de una sonda dentro de una muestra superpuesta sobre un sustrato, en donde la sonda comprende una pluralidad de etiquetas dispuestas espacialmente, en donde una primera etiqueta en la pluralidad de etiquetas se asocia con una primera posición sobre el sustrato que emite luz en un primer intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda y una segunda etiqueta en la pluralidad de etiquetas se asocia con una segunda posición sobre el sustrato que emite luz en un segundo intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda;

cuyo sistema informático comprende:

una unidad de procesamiento central; y

15 una memoria, acoplada con la unidad de procesamiento central, donde la memoria almacena un módulo de almacenamiento de datos, un módulo de identificación de etiquetas y un módulo de identificación de sondas, en donde el sistema informático está adaptado para realizar un método según la reivindicación 1;

donde el módulo de almacenamiento de datos comprende instrucciones para almacenar la pluralidad de imágenes de luz;

20 cuyo módulo de identificación de etiquetas comprende instrucciones para identificar la pluralidad de etiquetas; y un módulo de identificación de sondas que comprende instrucciones para determinar si la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas comprende la secuencia indicadora válida.

25 13. El sistema informático según la reivindicación 12, en donde la memoria también almacena una tabla de búsqueda que comprende una pluralidad de secuencias indicadoras válidas y en donde el módulo de identificación de sondas también comprende instrucciones para comparar la secuencia de cadenas de la pluralidad de etiquetas con las secuencias indicadoras válidas en la tabla de búsqueda.

14. El sistema informático según la reivindicación 12, en donde el módulo de almacenamiento de datos también comprende instrucciones para alinear una primera imagen de luz con una segunda imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz usando una pluralidad de fiduciarios presentes sobre el sustrato.

30 15. El sistema informático según la reivindicación 12, en donde el módulo de identificación de etiquetas también comprende instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas candidatas en la pluralidad de imágenes de luz, y en donde dicha pluralidad de etiquetas es un subgrupo de la pluralidad de etiquetas candidatas que fueron validadas por el módulo de identificación de etiquetas.

35 16. El sistema informático según la reivindicación 12, en donde el módulo de identificación de etiquetas también comprende:

instrucciones para identificar una primera etiqueta candidata en la pluralidad de imágenes de luz; e

instrucciones para identificar una segunda etiqueta candidata en la pluralidad de imágenes de luz que está dentro de una distancia predeterminada de la primera etiqueta candidata;

en donde la pluralidad de etiquetas comprende la primera etiqueta candidata y la segunda etiqueta candidata.

40 17. Un sistema que comprende el sistema informático según la reivindicación 12 y un mecanismo de medición de luz que mide la pluralidad de imágenes de luz.

18. El sistema según la reivindicación 17, en donde el sistema también comprende un mecanismo de iluminación que ilumina el sustrato.

19. El sistema según la reivindicación 17, en donde el mecanismo de medición de luz comprende:

45 una pluralidad de filtros de longitud de onda de medición, en donde cada filtro de longitud de onda de medición en la pluralidad de filtros de longitud de onda de medición se usa en una correspondiente imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz para rechazar la luz no dentro de un correspondiente intervalo espectral;

un fotodetector que forma una señal de detección en respuesta a la luz emitida de la muestra; y/o

un circuito detector dirigido por la señal de detección que mide la luz emitida de la muestra superpuesta sobre el sustrato,

5 donde el mecanismo que mide la luz también comprende una memoria electrónica para almacenar una pluralidad de imágenes de luz, en donde cada imagen de luz en la pluralidad de imágenes de luz es para luz recibida de la muestra a un intervalo de longitud de onda en la pluralidad de diferentes intervalos de longitud de onda.

20. El sistema según la reivindicación 17, en donde el mecanismo de identificación de etiquetas comprende instrucciones para identificar una pluralidad de etiquetas candidatas en la pluralidad de imágenes de luz y en donde la pluralidad de etiquetas es un subgrupo de la pluralidad de etiquetas candidatas.

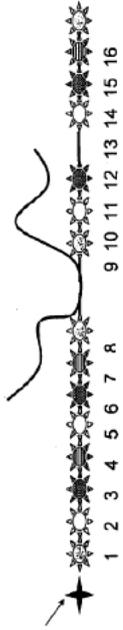


Figure 1A

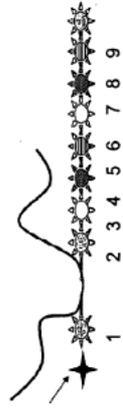


Figure 1B



Figure 1C



Figure 1D



Figure 1E

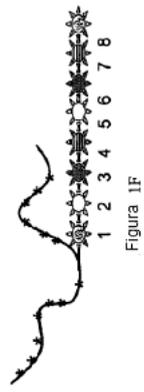


Figure 1F

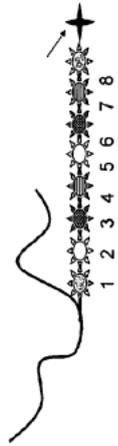


Figura 1D



Figura 1E



Figura 1F

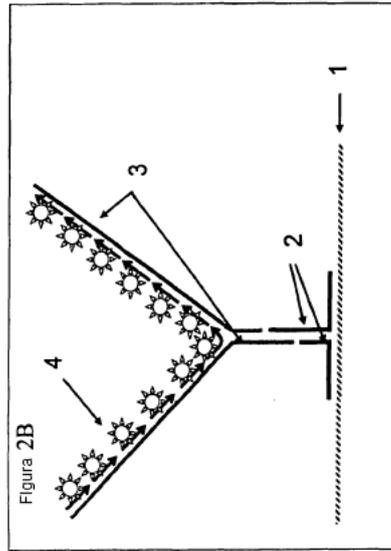
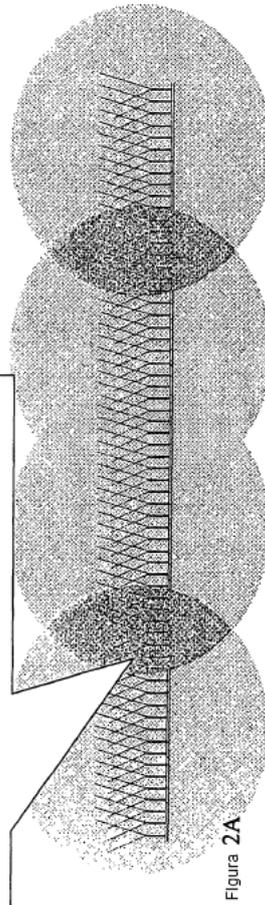


Figura 2C



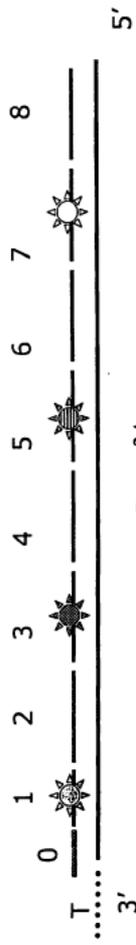


Figura 3A

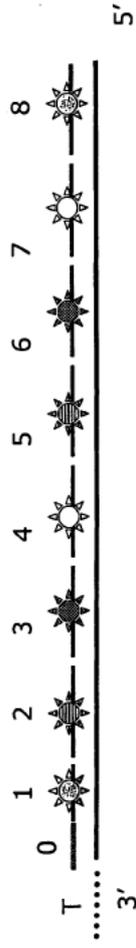


Figura 3B

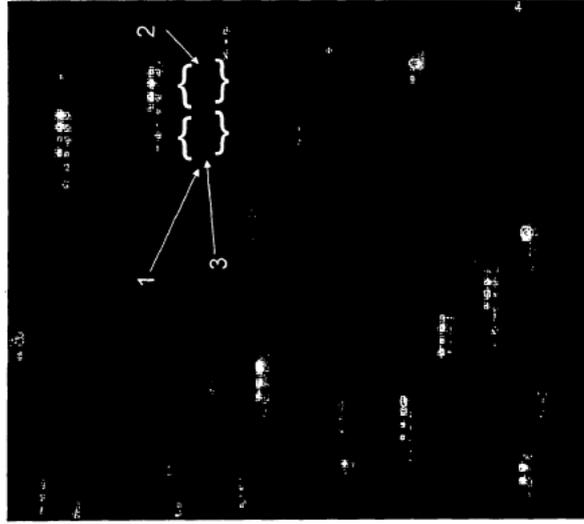


Figura 4

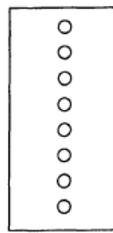
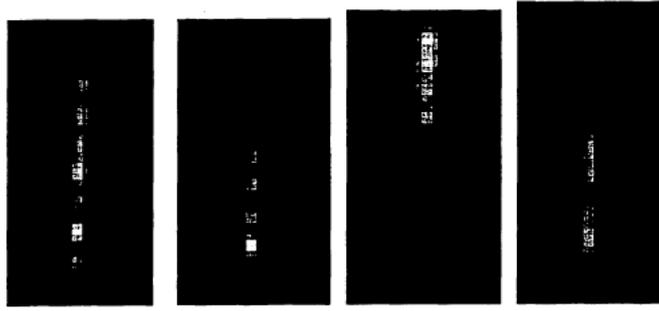


Figura 5A

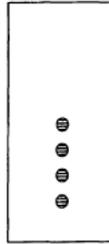


Figura 5B

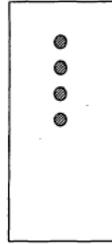


Figura 5C

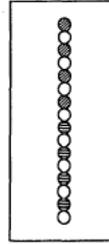


Figura 5D

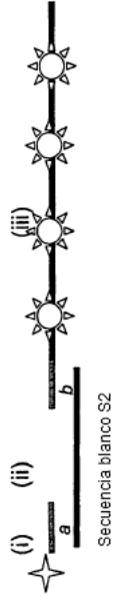


Figura 6E



Figura 6A



Figura 6D

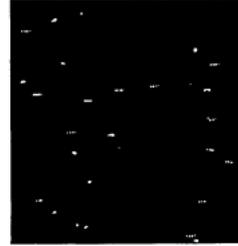
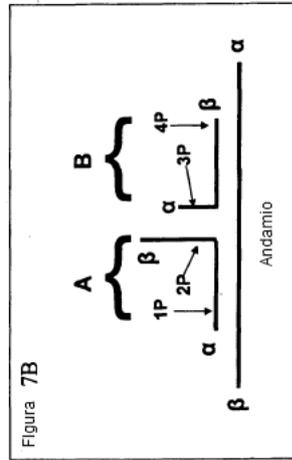
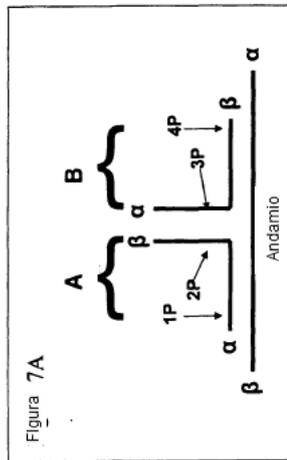
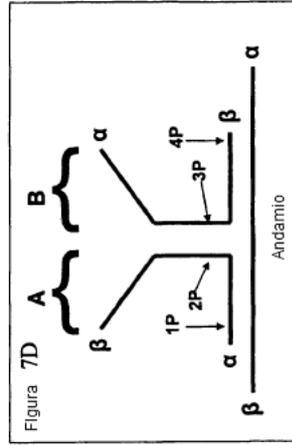
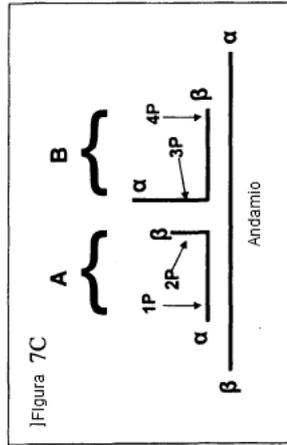
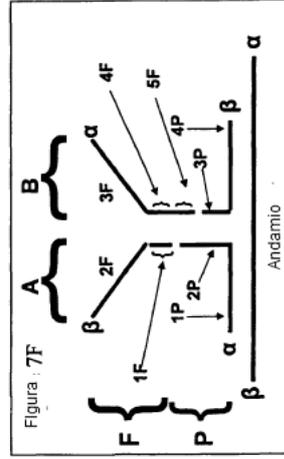
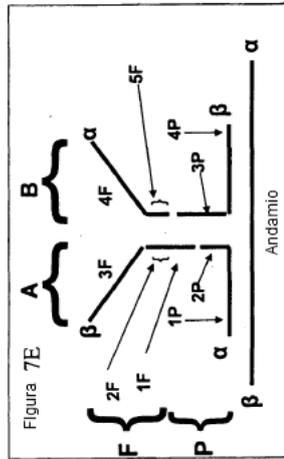
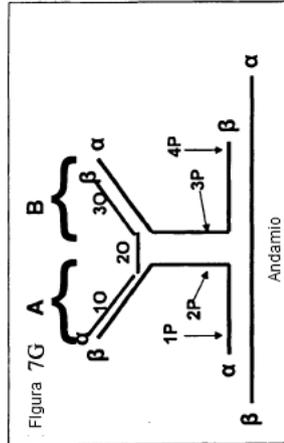


Figura 6C



Figura 6B





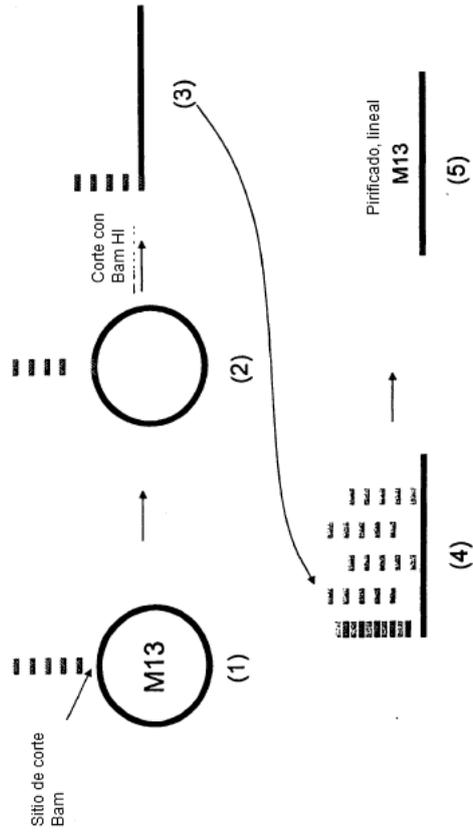


Figura 8

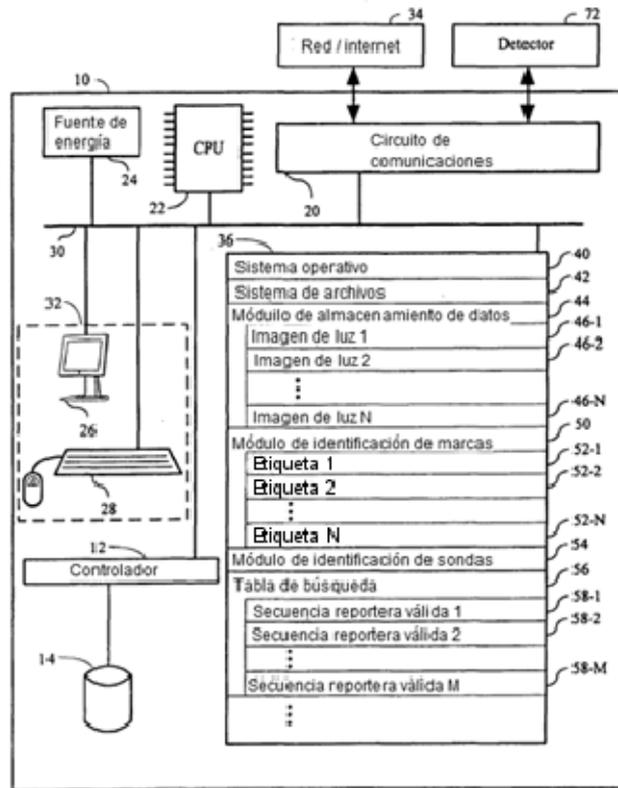


Figura 9



Figura 10A



Figura 10B



Figura 10C

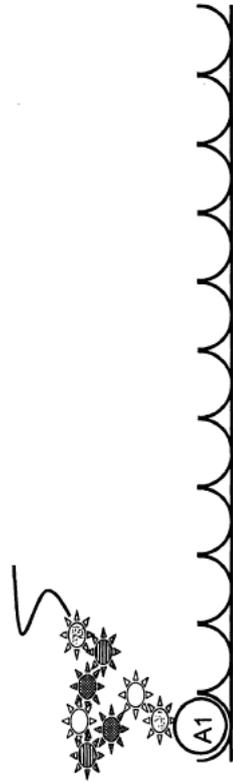


Figura 11A

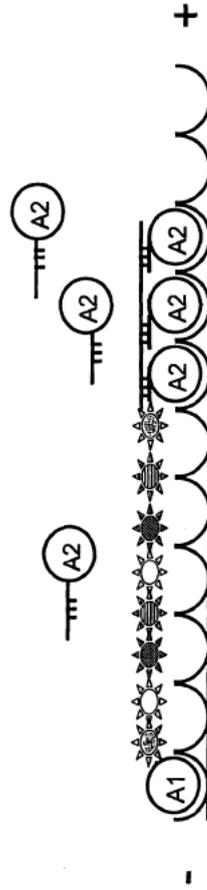
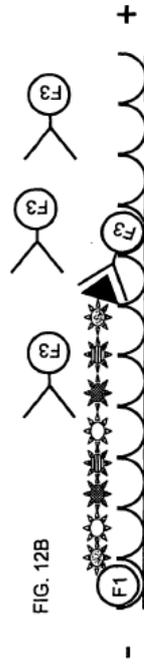


Figura 11B

FIG. 12A



FIG. 12B





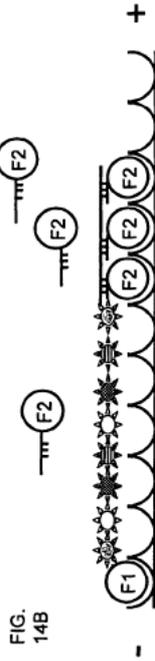
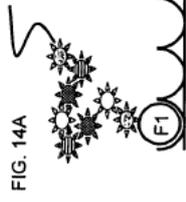


FIG. 14C

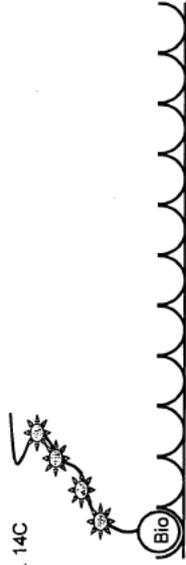
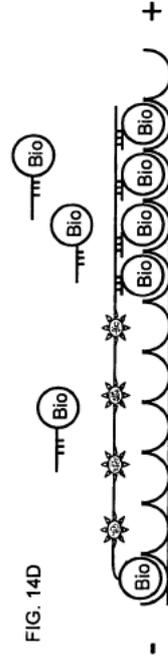


FIG. 14D



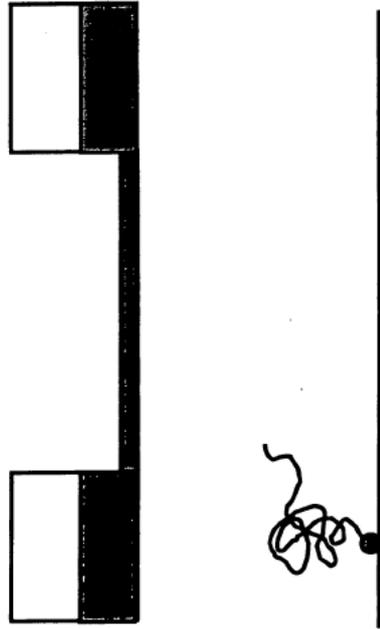


Figura 15A

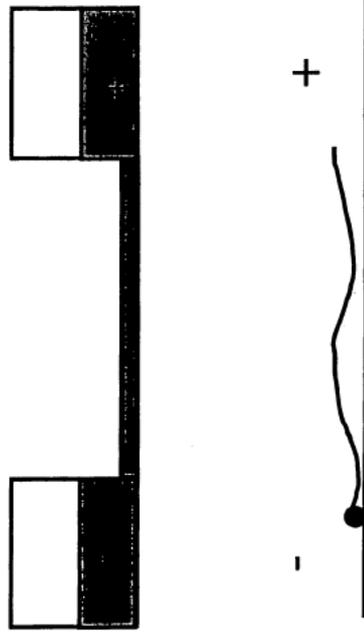


Figura 15B

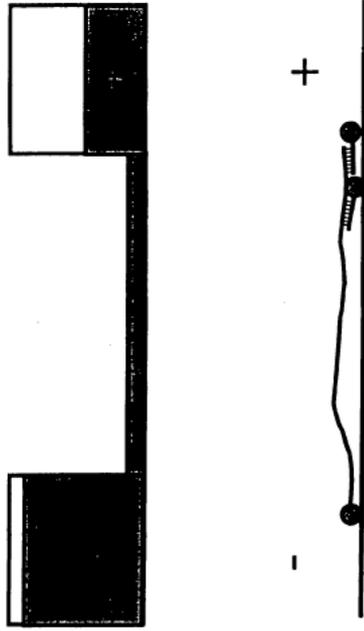


Figura 15C

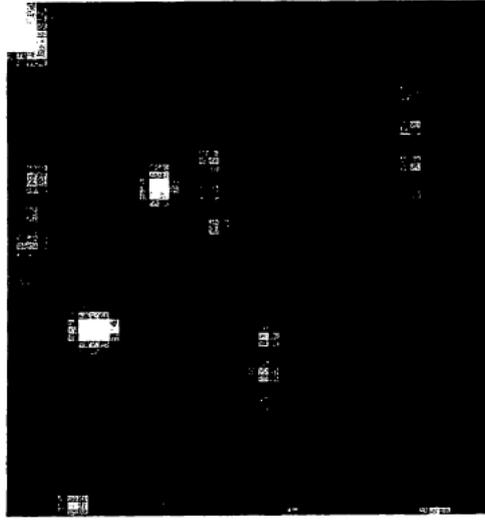


Figura 16