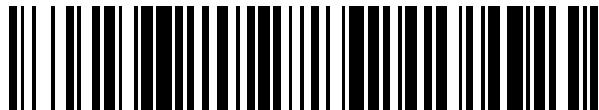


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 063**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2010 PCT/US2010/052556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11047087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2010 E 10824048 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2488876**

54 Título: **Detección de proteína a través de nanoinformadores**

30 Prioridad:

**16.04.2010 US 325224 P**

**22.04.2010 US 326787 P**

**13.10.2009 US 251192 P**

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

**26.07.2017**

73 Titular/es:

**NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC (100.0%)**

**530 Fairview Ave N, Ste 2000**

**Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**DUNAWAY, DWAYNE, L.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 627 063 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Detección de proteína a través de nanoinformadores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de detección, cuantificación, identificación y análisis múltiples de proteínas usando las herramientas de biología molecular para generar constructos nanoinformadores únicos y los métodos para su utilización.

Antecedentes de la invención

10 Con la reciente finalización del análisis del genoma humano, mucha atención se está desplazando ahora al campo de la proteómica, donde los productos génicos (proteínas), sus variantes, los patrones que interactúan y la dinámica de su regulación y procesamiento son el énfasis del estudio. Tales estudios son esenciales para entender, por ejemplo, los mecanismos detrás de los trastornos genéticos y ambientalmente inducidos o las influencias de las terapias mediadas por fármacos, así como potencialmente convertirse en el fundamento subyacente para otros análisis clínicos y de diagnóstico. Es crítico para estos estudios la capacidad para determinar cualitativamente variantes específicas de proteínas completas (por ejemplo, variantes de empalme, mutaciones puntuales, versiones modificadas

15 postraduccionalmente y modificaciones inducidas ambiental/terapéuticamente) y la capacidad de observar su modulación cuantitativa. Además, cada vez es más importante realizar estos análisis no sólo de uno, sino de múltiples fluidos/extractos biológicos. Existen métodos limitados de tecnologías de medición de proteína multiplexada debido a los desafíos adicionales inherentes a las muestras de proteínas.

20 El documento WO 2007/076128 describe composiciones y métodos para la detección y cuantificación de moléculas diana individuales en muestras biomoleculares.

El documento US 6.268.147 se refiere a un método para analizar ADN genómico y secuencias expresadas usando oligonucleótidos auxiliares.

25 El documento WO 03/003810 se refiere a un método para detectar un analito de ácido nucleico usando sondas marcadas; y el documento WO 2005/071401 describe un método para la detección de múltiples secuencias diana de ácido nucleico.

Blank, K. et al.: "Double-chip protein arrays: force-based multiplex sandwich immunoassays with increased specificity", Analytical and Bioanalytical Chemistry., Vol. 379, no. 7-8, páginas 974-981, de abril de 2004, describe un ensayo de proteínas usando sondas marcadas.

30 El documento WO 2008/124847 se refiere a composiciones y métodos para la detección y cuantificación de moléculas diana individuales en muestras biomoleculares

Kang, Y. et al.: "Electrochemical detection of thrombin by sandwich approach using antibody and aptamer", Bioelectrochemistry., vol. 73, no. IS.1., páginas 76-81, junio de 2008; Sasajima, Y. et al.: "Detection of protein tyrosine phosphorylation by open sandwich fluoroimmunoassay", Biotechnology Progress., vol. 22, no. 4, páginas 968-973, julio de 2006; Y Han, X.X. Et al.: "Protein-mediated sandwich strategy for surface-enhanced Raman scattering: application to versatile protein detection", Analytical Chemistry, vol. 81, no. 9., páginas 3350-3355, mayo de 2009, proporcionan

35 métodos para la detección de proteínas.

Sin embargo, la medición de proteínas en el fluido biológico es difícil debido a sus propiedades inherentes. En consecuencia, existe una necesidad apremiante de enfoques analíticos rápidos, sensibles, reproducibles y precisos para el análisis de proteínas y sus variantes.

40 Con el fin de analizar proteínas de interés desde y dentro de su entorno nativo, son necesarios ensayos capaces de evaluar proteínas presentes en una variedad de fluidos y/o extractos biológicos, tanto cualitativa como cuantitativamente.

Resumen de la invención

45 La descripción proporciona métodos y composiciones para el análisis de proteínas, incluyendo métodos y composiciones para la detección y/o cuantificación de proteínas en una muestra.

50 La invención proporciona un método para determinar la concentración de al menos una proteína en una muestra que comprende las etapas de: (a) proporcionar: (i) al menos una proteína, (ii) una primera sonda de proteína específica para una primera región de al menos una proteína, en donde la primera sonda de proteína está unida a una primera región de captura o a una primera matriz, (iii) una segunda sonda de proteína específica para una segunda región de al menos una proteína, en donde la segunda sonda de proteína comprende una señal oligo, y (iv) cuando la primera sonda está unida a una primera región de captura: una segunda matriz que tiene unida a ella una fracción que es capaz de unirse a la región de captura en la primera sonda de proteína; (b) formar al menos un primer complejo que comprende al menos una proteína, la primera sonda de proteína y la segunda sonda de proteína, en donde al menos una proteína está unida

- a las primera y segunda sondas de proteína y en donde cuando la primera sonda está unida a una primera región de captura, la sonda de captura está unida a la fracción en la segunda matriz; (c) liberar el oligo señal del primer complejo; (d) formar un segundo complejo que comprende (1) al menos el oligo señal y (2) al menos una sonda de oligo que comprende una región oligoespecífica de la señal y una región que comprende un nanoinformador en donde el nanoinformador comprende una pluralidad de diferentes etiquetas detectables; y (e) detectar individualmente el segundo complejo o al menos parte del segundo complejo por un método que comprende contar individualmente la presencia de la pluralidad de diferentes etiquetas detectables del nanoinformador, en donde el recuento de la pluralidad de diferentes etiquetas detectables es indicativo de la concentración de la proteína en la muestra. En algunas realizaciones, la detección individual comprende además la detección de una señal digital.
- 5
- 10 Una fracción se refiere a y se conoce también como una entidad. Una fracción de la invención está operativamente unida a una matriz y se une con una región de captura de una primera sonda de proteína. La fracción está unida operativamente a la matriz por un enlace físico o químico, incluyendo, pero no limitado a, un enlace covalente, un enlace no covalente, un enlace electrónico, un enlace flexionado, un enlace aromático, un enlace metálico, un enlace de hidrógeno, un enlace iónico, o fuerzas de van der Waals. La fracción se une con una región de captura de una primera sonda de proteína a través de cualquiera de los enlaces físicos o químicos descritos en la presente memoria, interacciones receptor-ligando, eventos de hibridación entre dos oligonucleótidos o interacciones entre un oligonucleótido y un polipéptido. Por ejemplo, una región de captura que contiene biotina se une a una fracción que contiene estreptavidina, formando un enlace fuerte no covalente, en el que una matriz unida a la estreptavidina, permite que la matriz se una a la región de captura de la primera sonda de proteína (véase, la Figura 1). Aunque se contemplan todas las interacciones receptor-ligando conocidas, se prefieren aquellas interacciones con una constante de disociación (Kd) entre 0,1 fM y 1000 nM. Los eventos de hibridación ocurren entre oligonucleótidos que tienen secuencias complementarias, sin embargo, no se requiere una complementariedad perfecta o completa. La invención abarca aquellos eventos de hibridación entre oligonucleótidos que tienen 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% y cualquier porcentaje de complementariedad entre ellos. Además, la asociación de un aptámero con una primera sonda de proteína proporciona un ejemplo no limitativo de una interacción preferida entre un oligonucleótido y un polipéptido.
- 15
- 20
- 25
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para determinar la concentración de al menos una proteína en una muestra que comprende las etapas: (a) proporcionar: (i) al menos una proteína (ii) una primera sonda de proteína específica para una primera región de al menos una proteína, en donde la primera sonda de proteína está unida a un primer oligo; (iii) una segunda sonda de proteína específica para una segunda región de al menos una proteína, en donde la segunda sonda de proteína está unida a un segundo oligo; (b) formar un primer complejo que comprende al menos una proteína, la primera sonda de proteína y la segunda sonda de proteína, en donde al menos una proteína está unida a la primera y segunda sondas de proteína, (c) ligar el primer y el segundo oligo para formar un oligo señal; (d) formar un segundo complejo que comprende (1) al menos el oligo señal y (2) al menos una sonda de oligo que comprende una región específica del oligo señal y una región que comprende un nanoinformador en el que el nanoinformador comprende una pluralidad de diferentes etiquetas detectables; y (e) detectar individualmente el segundo complejo o al menos parte del segundo complejo por un método que comprende contar individualmente la presencia de la pluralidad de diferentes etiquetas detectables del nanoinformador, en el que el recuento de la pluralidad de diferentes etiquetas detectables es indicativo de la concentración de la proteína en la muestra. En algunas realizaciones, se determina la concentración de dos o más proteínas diana. En algunas realizaciones, se determina la concentración de 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000 o más de 1.000 proteínas diana diferentes. En algunas realizaciones, se determina la concentración de al menos 972 proteínas diana diferentes.
- 30
- 35
- 40
- En algunas realizaciones, la matriz se selecciona del grupo que consiste en una perla y una disposición. En algunas realizaciones, la matriz es una perla. En algunas realizaciones en las que se analiza una pluralidad de proteínas diana, la matriz es una perla y cada fracción en cada complejo de la pluralidad del complejo se une a una perla diferente. En algunas realizaciones, la matriz es una superficie. En algunas realizaciones en las que se analiza una pluralidad de proteínas diana, la matriz es una superficie y cada fracción en cada complejo de la pluralidad de complejo está unido a una ubicación diferente de la superficie.
- 45
- En algunas realizaciones, la primera sonda de proteína y la segunda sonda de proteína se seleccionan independientemente del grupo que consiste en anticuerpo, péptido, aptámero y peptoide.
- 50
- 55
- En algunas realizaciones, el nanoinformador comprende una cadena principal de ácido nucleico de cadena sencilla, comprendiendo la cadena principal una pluralidad de regiones de fijación de marcadores unidas covalentemente entre sí en una combinación lineal, en la que cada región de fijación de marcadores se hibrida a una secuencia complementaria de polinucleótidos que tiene unida a la misma el marcador detectable. En algunas realizaciones, el nanoinformador se fija a la segunda sonda a través de hibridación con un oligonucleótido enlazador. En algunas realizaciones, el nanoinformador se hibrida con el oligo enlazador a una temperatura de aproximadamente 32 grados Celsius (°C) hasta aproximadamente 40°C. En algunas realizaciones, el nanoinformador se hibrida con el oligo enlazador a una temperatura de aproximadamente 37°C. En algunas realizaciones, el nanoinformador comprende una parte que es complementaria al oligo enlazador. En algunas realizaciones, la región complementaria es de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 bases.
- 60 Breve descripción de los dibujos

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que presenta realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos, de los cuales:

5 La Figura 1 es un diagrama esquemático que representa una realización de la invención en la que dos anticuerpos específicos para una proteína diana se unen a la proteína diana en solución. El primer anticuerpo está unido a un marcador de afinidad tal como biotina (representado como un círculo marcado como "B"), mientras que el segundo anticuerpo está unido a una sonda de ácido nucleico parcialmente de doble cadena. La unión del primer y segundo anticuerpos a la proteína diana forma un complejo que se aísla de la solución a través del marcador de afinidad del primer anticuerpo. Una de las cadenas de la sonda de ácido nucleico parcialmente de doble cadena puede ser eluida para generar un oligo señal, que puede ser analizado por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

10 La Figura 2 es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de detección usando la proteína diana de IL-2 a diferentes concentraciones. Específicamente, se midió la detección de IL-2 dentro de soluciones que no contenían bloqueador, leche al 0,03%, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% o esperma de salmón (SS) a razón de 98 ng/ml como los recuentos totales detectados en función de la concentración molar creciente de proteína diana de IL-2 ([objetivo IL2, M]).

15 La Figura 3 es un gráfico que representa la eficacia de la detección de IL-2 en el ensayo utilizado en la Figura 2. Los recuentos totales detectados se normalizaron a 600 moléculas por campo de visión (FOV) y se expresaron como una función de concentración creciente de moléculas de proteína diana de IL2 [IL2 objetivo, moléculas]. La eficacia de la detección es la pendiente de la línea representada en este gráfico.

20 La Figura 4 es un diagrama esquemático que representa dos realizaciones alternativas de la invención para la unión tripartita en solución. De acuerdo con este método, dos anticuerpos específicos para una proteína diana se unen a esa proteína diana en solución. El primer anticuerpo se une a un marcador de afinidad tal como biotina y contiene una región constante, que contiene, por ejemplo, repeticiones F. El segundo anticuerpo está unido a una sonda de nanoinformador y una segunda región constante, que, por ejemplo, contiene, repeticiones G. La unión del primer y segundo anticuerpos a la proteína diana forma un complejo que puede aislarse de la solución a través del marcador de afinidad del primer anticuerpo. La elución "normal" del complejo se logra por fusión de la perla G y F. La elución "alternativa" del complejo se lleva a cabo mediante digestión. Los monómeros marcadores del nanoinformador (representados como círculos) emiten señales individuales de longitudes de onda cualitativamente diferentes que se distinguen espacialmente y son, de izquierda a derecha, rojo (R), amarillo (Y), verde (G), azul (B), rojo (R) y violeta (V).

25 La Figura 5 es un gráfico que representa la constante de disociación (Kd) y la concentración de la sonda para una de las realizaciones de la invención, expresada como la fracción del objetivo unido frente a la Kd de la sonda nanoinformadora y la sonda de proteína.

30 La Figura 6 es un diagrama esquemático que representa una realización de la invención en la que un anticuerpo de captura específico para una proteína diana se une a la proteína diana en solución para formar un complejo. El complejo puede aislarse después de la solución. El complejo se pone entonces en contacto con un segundo anticuerpo, en donde el segundo anticuerpo se une a una sonda de ácido nucleico parcialmente de doble cadena. Una de las cadenas de la sonda de ácido nucleico de doble cadena puede ser eluida para generar un oligo señal que puede ser analizado por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

35 Las Figuras 7A y 7B son diagramas esquemáticos que representan una realización de la invención en la que dos anticuerpos específicos para una proteína diana se unen a la proteína diana en solución. El primer anticuerpo es un anticuerpo de captura, mientras que el segundo anticuerpo se une a una sonda de ácido nucleico parcialmente de doble cadena, donde una de las cadenas de la sonda está unida a un marcador de afinidad tal como biotina. La unión del primer y segundo anticuerpos a la proteína diana formó un complejo que se puede aislar de la solución a través del anticuerpo de captura. Una de las cadenas de la sonda de ácido nucleico de doble cadena puede ser eluida para generar una señal de oligo que contiene el marcador de afinidad. El oligo señal se puede hibridar entonces con un nanoinformador para formar un complejo oligo señal-nanoinformador que puede aislarse y/o inmovilizarse en una superficie sólida. El complejo de oligo señal-nanoinformador puede analizarse por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Los monómeros del marcador del nanoinformador (representados como círculos) emiten señales individuales de longitudes de onda cualitativamente diferentes que se distinguen espacialmente y son, de izquierda a derecha, roja (R), amarilla (Y), verde (G), azul (B), roja (R) y violeta (V).

40 La Figura 8A es un diagrama esquemático que representa ciertas realizaciones de la invención usando ligación de proximidad. Un primer y un segundo oligo se unen a un primer y un segundo anticuerpo, respectivamente, siendo ambos anticuerpos específicos para una proteína diana. El primer y segundo anticuerpos se unen a la proteína diana, poniendo el primer y segundo oligo muy cerca entre sí. Un oligonucleótido puente y una ligasa se añaden a la solución para conectar el primer y segundo oligo para generar un oligo señal. El oligo señal puede entonces ser analizado por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

45 Las Figuras 8B-D son diagramas esquemáticos que representan métodos mediante los cuales el oligo señal mostrado en la Figura 8A puede ser liberado y purificado.

La Figura 9 es un diagrama esquemático que representa ciertas realizaciones de la invención usando ligación de proximidad. Los monómeros de marcación del nanoinformador (representados como círculos) emiten señales individuales de longitudes de onda cualitativamente diferentes que se distinguen espacialmente y son, de izquierda a derecha, roja (R), amarilla (Y), verde (G), azul (B), roja (R) y violeta (V).

5 La Figura 10 es un gráfico que representa los resultados de la detección de la proteína multiplexada TNF-alfa, IL1 alfa, IL6 y VEGF, medida como recuentos totales detectados en función del aumento de la concentración diana de la proteína ([diana de proteína]). En este ejemplo, se usó un ensayo de detección en sándwich en solución. Se muestra una medición de 4 plex.

10 La Figura 11 es un gráfico que representa los datos analizados en la Figura 10, trazados por carril en lugar de por concentración. Específicamente, esta figura demuestra que se valoraron dentro dos proteínas diana mientras que se valoraron fuera otras dos dianas de proteína.

15 La Figura 12 es un gráfico que representa los resultados de un experimento de límite de detección (LOD) usando dos dianas de proteína, IL1alfa e IL6. Los recuentos totales detectados se representaron como una función del aumento de la concentración molar de la proteína diana ([diana] molar). El experimento demostró que los límites de detección eran de 26 y 38 picogramos por mililitro (pg/ml), correspondientes a  $1,4 \times 10^{-12}$  M y  $1,9 \times 10^{-12}$  M para IL1alfa (IL1 $\alpha$ ) e IL6, respectivamente. El límite de detección estaba dos desviaciones estándar por encima de los niveles de detección de fondo. Se realizaron seis controles negativos, resultando en recuentos promedio de más o menos una desviación estándar, es decir,  $3.196 \pm 265$  y  $6.703 \pm 585$ , respectivamente.

20 La Figura 13 es un gráfico que representa los recuentos totales retenidos por diversos componentes del complejo informador de anticuerpos (PROX01, PROX03, PROX04, PROX05 y PROX06) después de la purificación y una etapa de aclarado usando agua o regulador SSPE de diversos valores de concentración (0,01X, 0,03X, o 0,1X). A 0,03X SSPE, se conservó el oligo que representaba un producto ligado, PROX05.

25 La Figura 14 es un gráfico que muestra los recuentos por campo de visión (FOV) para cada sonda de anticuerpo en un informador que se une, estira e inmoviliza (S17, S8, S22, S14, S23, S6, S13, S7, S18, S9, S10, S11, S12, S15, S16, S19, S20 y S21). Únicamente se muestran los recuentos del informador con la sonda de anticuerpo que se une a la superficie.

#### Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la técnica al que pertenece esta invención.

30 La descripción proporciona composiciones y métodos para la detección y cuantificación de moléculas diana individuales en muestras biomoleculares. En particular, la descripción proporciona sondas de proteína que son capaces de unirse a moléculas diana individuales. La divulgación también proporciona el uso de nanoinformadores. A través de los códigos marcadores de los nanoinformadores, la unión de las sondas de proteína a las moléculas diana da como resultado la identificación de las moléculas diana. También se proporcionan métodos para fabricar y usar tales sondas de proteína y/o nanoinformadores. Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden usarse en una amplia variedad de aplicaciones tales como diagnóstico, pronóstico, control de calidad y aplicaciones de cribado.

35 Ciertos aspectos de la descripción se refieren a la detección de múltiples moléculas diana. La multiplexación es la medición de más de una molécula diana dentro de una muestra sin tener que dividir la muestra. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan beneficios potenciales en las áreas de multiplexación, cuantificación y sensibilidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones la molécula diana es una proteína. La medición de las concentraciones de proteínas es un desafío. Las proteínas son pegajosas y tienden a agregarse. Además, las proteínas son inestables y tienden a desplegarse más fácilmente que el ARN o el ADN. Extremos en pH, temperaturas, concentración de soluto, y la presencia de desnaturizantes son condiciones que pueden interrumpir la estabilidad de la proteína y complicar la medición. La descripción proporciona métodos y composiciones para mediciones de proteínas multiplexadas que son sensibles y confiables.

40 La multiplexación dentro de una muestra de fluido es una ventaja clave de este enfoque. La multiplexación dentro de una muestra ahorra trabajo en forma significativa, reduce los requisitos de cantidad de muestra proporcional al número de mediciones y mejora la precisión mediante la eliminación de errores compuestos por etapas separadas de manipulación de muestras y de medición. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento permiten el agrupamiento de diferentes muestras durante el procesamiento para ser analizadas de una vez. Esto ofrece ventajas de rendimiento y puede acelerar el análisis de diferentes muestras, por ejemplo, hasta ocho veces.

45 En algunas realizaciones, la descripción proporciona sondas de proteína para el análisis de moléculas diana. En algunas realizaciones, la descripción proporciona una población de sondas de proteína para su uso en un ensayo multiplexado. Cada sonda de proteína en la población es específica para una molécula diana. La unión de las moléculas diana a las sondas de proteína se detecta entonces usando nanoinformadores. Cada nanoinformador comprende un código de marcación único que puede estar asociado a una molécula diana específica.

En algunas realizaciones, los nanoinformadores están unidos, directa o indirectamente, a las sondas de proteína. A continuación, se asigna un código de marcación único del nanoinformador a una sonda de proteína específica de modo que cada código de marcación del nanoinformador pueda estar asociado a la molécula diana unida a la sonda de proteína.

5 En otras realizaciones, las sondas de proteína están unidas, directa o indirectamente, a un oligo señal. Cada sonda de proteína está unida a un oligo señal único. Los nanoinformadores utilizados para el análisis del oligo señal comprenden una parte que es complementaria al oligo señal. Se asigna un código de marcación único de un nanoinformador a una secuencia de oligo señal específico de modo que el código de marcación de cada nanoinformador puede estar asociado a la molécula diana a través de la secuencia de oligo señal.

10 Las moléculas diana pueden detectarse midiendo digitalmente las señales. Las tecnologías actuales utilizan señales fluorescentes analógicas para cuantificar la presencia de moléculas diana. La cuantificación mediante fluorescencia puede estar propensa a errores por una variedad de razones. Por ejemplo, los fluoróforos pueden ser fotobloqueados. Puede haber cambios en los espectros en presencia de proteínas o debido al entorno local, por ejemplo, pH, sales. Además, las fuentes de luz pueden variar en intensidad con el tiempo. Por ejemplo, las lámparas de arco, una fuente de luz comúnmente utilizada, demuestran un fenómeno llamado precesión de arco que puede causar niveles de iluminación significativamente diferentes con el tiempo. Las moléculas diana se detectan digitalmente. Aunque la fluorescencia podría ser utilizada para leer el código de marcación del nanoinformador, las señales son altas y la marca luminosa está presente o no, y, por lo tanto, la detección digital. La detección digital de moléculas diana conduce a una cuantificación más precisa.

20 Sondas de proteína

Las sondas de proteína son moléculas o disposiciones que están diseñadas para unirse con al menos una proteína diana, al menos un sustituto de proteína diana, o ambos; y pueden, en condiciones apropiadas, formar un complejo molecular que comprende la sonda de proteína y la proteína diana. Los términos "proteína", "polipéptido", "péptido" y "secuencia de aminoácidos" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por moléculas diferentes a aminoácidos o aminoácidos sintéticos. Los términos incluyen también un polímero de aminoácidos que se ha modificado, por ejemplo, mediante formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipídación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente de marcación. Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo, pero sin limitación, glicina y los isómeros ópticos D o L y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Los métodos de la presente invención también incluyen sondas de proteína diseñadas para unirse a objetivos distintos de las proteínas. Ejemplos de objetivos distintos de proteínas incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, iones, moléculas pequeñas, monómeros orgánicos y fármacos. Por conveniencia solamente, la mayoría de las realizaciones descritas aquí se explican en el contexto de las sondas de proteína que se unen a una proteína diana. Sin embargo, estas realizaciones también se pueden aplicar a otras moléculas diana.

Las sondas de proteína típicamente son parte de al menos un conjunto de sondas, que comprende al menos una primera sonda y al menos una segunda sonda. Sin embargo, en ciertas realizaciones, al menos un conjunto de sondas puede comprender solamente primeras sondas o segundas sondas, pero no las primeras sondas o las segundas sondas al mismo tiempo. Las sondas comprenden al menos una porción de reacción que les permite unirse a, o interactuar con al menos una proteína diana, al menos una parte de al menos una proteína diana, al menos un sustituto de proteína diana, al menos parte de un sustituto de proteína diana, o combinaciones de los mismos; típicamente en una forma específica de la secuencia, específica de la confirmación, o ambas; por ejemplo, pero sin limitarse a, unión de antígeno-anticuerpo, unión de aptámero-diana, y similares.

45 En ciertas realizaciones, las sondas de proteína comprenden una porción de identidad o al menos parte de una porción de identidad, por ejemplo, un oligo señal, un nanoinformador y/o oligo enlazador. En ciertas realizaciones, las sondas de proteína comprenden una región de captura. En algunas realizaciones, la región de captura se usa para el aislamiento de la sonda de proteína y/o inmovilización de la sonda de proteína en una superficie. La región de captura puede ser un marcador de afinidad como se describe a continuación, una perla, una lámina o una matriz.

50 En algunas realizaciones, la sonda de proteína es un anticuerpo. Como se usa en este documento, los términos anticuerpo y anticuerpos se usan en un sentido amplio, para incluir no sólo moléculas de anticuerpo intactas, por ejemplo, pero no limitadas a inmunoglobulina A, inmunoglobulina G e inmunoglobulina M, sino también cualquier componente o componentes inmunorreactivos de una molécula de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a al menos un epítopo. Tales componentes inmunorreactivos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), minianticuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos entrecruzados, Affibody<sup>MR</sup>, ciclótidos, moléculas y similares. Los productos inmunorreactivos derivados usando técnicas de modificación de anticuerpos o técnicas de modificación de proteínas también están expresamente dentro del significado del término anticuerpos. Se pueden encontrar descripciones detalladas de la modificación de anticuerpos y/o proteínas, incluyendo protocolos relevantes, que pueden encontrarse, entre otros lugares, en J.

Maynard y G. Georgiou, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2: 339-76 (2000); *Antibody Engineering*, R. Kontermann y S. Dubel, eds., Springer Lab Manual, Springer Verlag (2001); patente estadounidense N° 5.831.012; y S. Paul, *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press (1995).

5 El experto en la técnica se dará cuenta que el anticuerpo puede obtenerse a partir de una variedad de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo monoespecífico, anticuerpo expresado de forma recombinante, anticuerpo humanizado, planticuerpos y similares; y se pueden obtener de una variedad de especies animales, incluyendo conejo, ratón, cabra, rata, humano, caballo, bovino, cobaya, pollo, oveja, burro, humano y similares. Una amplia variedad de anticuerpos está disponible comercialmente y se pueden obtener anticuerpos hechos a medida a partir de una serie de laboratorios por contrato. Las descripciones detalladas de anticuerpos, incluyendo protocolos relevantes, pueden encontrarse, entre otros lugares, en *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., John Wiley & Sons (1999, incluyendo las actualizaciones hasta agosto de 2003); *The Electronic Notebook; Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, G. Howard y D. Bethel, eds., CRC Press (2000); J. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 3d Ed., Academic Press (1996); E. Harlow y D. Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Lab Press (1999); P. Shepherd y C. Dean, *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); A. Johnstone y M. Turner, *Immunochemistry 1 and 2*, Oxford University Press (1997); C. Borrebaeck, *Antibody Engineering*, 2ª ed., Oxford University Press (1995); A. Johnstone y R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Science, Ltd. (1996); H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives (Basics: From Background to Bench)*, Springer Verlag (2000); y S. Hockfield et al., *Selected Methods for Antibody and Nucleic Acid Probes*, Cold Spring Harbor Lab Press (1993). Además, un gran número de anticuerpos comercialmente disponibles, incluyendo marcados o no marcados; anticuerpos policlonales, monoclonales y monoespecíficos, así como sus componentes inmunorreactivos; proveedores de anticuerpos personalizados y similares se pueden encontrar en la World Wide Web, entre otros lugares, en la página Antibody Search en biocompare.com, la página Antibody Resource en anticorposresource.com, y la página Antibody Explorer en sigmaaldrich.com.

25 En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se unen a un ácido nucleico, por ejemplo, oligo señal, oligo y/o nanoinformador enlazador. Se conocen en la técnica métodos para unir ácidos nucleicos a anticuerpos. Puede utilizarse cualquier método adecuado para unir ácidos nucleicos a anticuerpos. Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden unirse a un ácido nucleico por los métodos descritos en Gullberg et al., *PNAS* 101 (22): páginas 228420 - 8424 (2004); y Boozer et al., *Analytical Chemistry*, 76 (23): páginas 6967 - 6972 (2004). Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden unirse a un ácido nucleico mediante unión aleatoria de amina. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden unirse a un ácido nucleico mediante unión aleatoria de amina utilizando una relación de 10 a 1 de ácido nucleico respecto al anticuerpo. Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden unirse a un ácido nucleico por los métodos descritos en Kozlov et al., *Biopolymers* 5: 73 (5): páginas 621 - 630 (2004). Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden unirse a un ácido nucleico mediante la química de la hidracina. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden unirse a un ácido nucleico usando renacuajos como se describe en Nolan, *Nature Methods* 2, 11-12 (2005). Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden unirse a un ácido nucleico mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica para generar anticuerpos manipulados, incluyendo los descritos aquí.

40 En algunas realizaciones, la sonda de proteína es un aptámero. Los aptámeros incluyen aptámeros de ácido nucleico (es decir, moléculas de ADN de cadena sencilla o moléculas de ARN de cadena sencilla) y aptámeros de péptidos. Los aptámeros se unen a moléculas diana de una manera altamente específica, dependiente de la conformación, típicamente con afinidad muy alta, aunque se pueden seleccionar, si se desea, aptámeros con menor afinidad de unión. Se ha demostrado que los aptámeros distinguen entre objetivos basados en diferencias estructurales muy pequeñas tales como la presencia o ausencia de un grupo metilo o hidroxilo y ciertos aptámeros pueden distinguir entre enantiómeros D y L. Se han obtenido aptámeros que se unen a objetivos moleculares pequeños, incluyendo fármacos, iones metálicos, y colorantes orgánicos, péptidos, biotina y proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a, estreptavidina, VEGF y proteínas virales. Se ha demostrado que los aptámeros retienen la actividad funcional después de la biotilación, marcación con fluoresceína y cuando se unen a superficies de vidrio y microesferas.

50 Los aptámeros de ácido nucleico, incluyendo los especúlmeros, se identifican mediante un proceso de selección in vitro conocido como evolución sistemática de ligandos mediante amplificación exponencial (SELEX). En el proceso SELEX, se criban sistemáticamente grandes bibliotecas combinatorias de oligonucleótidos, por ejemplo  $10^{14}$  a  $10^{15}$  secuencias individuales, a menudo tan grandes como 60-100 nucleótidos de longitud, mediante un proceso iterativo de selección y amplificación in vitro. La mayoría de los objetivos son enriquecidos por afinidad en 8-15 ciclos y el proceso ha sido automatizado permitiendo un aislamiento de aptámeros más rápido. Los aptámeros de péptidos se identifican típicamente mediante diversas técnicas diferentes de modificación de proteínas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, despliegue en fagos, despliegue en ribosomas, despliegue en ARNm, tecnología de fagos selectivamente infectados (SIP) y similares. El experto en la técnica comprenderá que se pueden obtener aptámeros de ácido nucleico y aptámeros de péptidos de acuerdo con procedimientos convencionales y sin experimentación excesiva. Se pueden encontrar descripciones detalladas de aptámeros, incluyendo protocolos relevantes, entre otros lugares, en L. Gold, *J. Biol. Chem.*, 270 (23): 13581 - 84 (1995); S. Jayasena, *Clin. Chem.*, 45: 1628 - 50 (1999); V. Sieber et al., *Nat Biotechnol.* 16 (10): 955 - 60 (1998); D. Wilson y J. Szostak, *Ann. Rev. Biochem.* 68: 611 - 47 (1999); L. Jermutus et al.,

Eur. Biophys. J., 31: 179 - 84 (2002); S S. Spada et al., Biol. Chem., 378: 445 - 56 (1997); B. Wlotzka et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 8898 - 8902 (2002).

5 En algunas realizaciones, el aptámero se ligará o hibridará con un oligo señal, un oligo enlazador y/o un nanoinformador. En algunas realizaciones, la ligación del aptámero a un nanoinformador se realiza antes de la hibridación de segmentos con marcadores a los nanoinformadores. La hibridación o ligación de aptámeros se puede realizar por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la ligación puede ser llevada a cabo enzimáticamente mediante al menos una ADN ligasa o al menos una ARN ligasa, por ejemplo, pero no limitada a, ADN ligasa T4, ARN ligasa T4, ligasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN ligasa de *Thermus aquaticus* (Taq) o ligasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu). La ligación también puede realizarse mediante ligación química, utilizando agentes activadores y reductores tales como carbodiimida, bromuro de cianógeno (BrCN), imidazol, 1-metilimidazol/carbodiimida/cistamina, N-cianoimidazol, ditiotreitolo (DTT) y luz ultravioleta.

10 En algunas realizaciones, la sonda de proteína es un peptido. Los peptoides son secuencias cortas de péptidos sintéticos de glicinas sustituidas en N que unen proteínas. En algunas realizaciones, los peptoides de tamaño pequeño mejoran la difusión y la cinética de los métodos descritos en la presente memoria. Cualquier método adecuado conocido en la técnica para generar peptoides está comprendido en los métodos descritos en la presente memoria. Véase Simon et al., PNAS 15; 89 (20): 9367 - 9371 (1992).

#### Proteínas objetivo

20 Las proteínas diana son la proteína detectada o medida por unión de una sonda de proteína cuya región o regiones específicas del objetivo la reconocen. Sin embargo, la descripción incluye la detección de otros objetivos más allá de proteínas tales como ácido nucleico, un lípido, un carbohidrato, una molécula pequeña, un monómero orgánico o un fármaco. Los ácidos nucleicos que pueden analizarse mediante los métodos de la presente invención incluyen: ADN de doble cadena, ADN de cadena sencilla, horquillas de ADN de cadena sencilla, híbridos de ADN/ARN, ARN (por ejemplo, ARNm o miARN) y horquillas de ARN. Por conveniencia solamente, los métodos descritos aquí se explican principalmente en el contexto del análisis de proteínas. Sin embargo, las realizaciones descritas en la presente memoria también pueden usarse para detectar objetivos no proteínicos.

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

30 Las composiciones, métodos y kits descritos en la presente memoria también pueden usarse en una amplia variedad de aplicaciones para determinar la presencia de proteínas diana en una muestra. Por ejemplo, pero sin limitación, las composiciones, métodos y kits son útiles para, estudios farmacocinéticos, incluyendo pero sin limitarse a, metabolismo de fármacos, perfilado de ADME y estudios de toxicidad; validación de objetivos para el descubrimiento de fármacos; perfiles de expresión de proteínas; análisis proteómico; estudios metabolómicos; estudios de modificación postraducción, incluyendo, pero sin limitarse a, glicosilación, fosforilación, acetilación y modificación de aminoácidos, tales como modificación de glutamato para formar glutamato de carboxi gamma e hidroxilación de prolina para formar hidroxilación; análisis de niveles específicos de anticuerpos séricos o mucosos; evaluación de indicadores de diagnóstico de ácidos no nucleicos; detección de antígenos foráneos; y similares.

40 En cierta realización, al menos una primera sonda de proteína, al menos una segunda sonda de proteína, o bien la primera sonda de proteína y la segunda sonda de proteína de al menos un conjunto sondas comprenden al menos un anticuerpo, aptámero o peptido que reacciona específicamente con al menos una proteína diana o al menos un sustituto de proteína diana. En ciertas realizaciones, al menos una primera sonda de proteína, al menos una segunda sonda de proteína o la primera sonda de proteína y la segunda sonda de proteína de al menos un conjunto de sondas comprenden proteínas de unión que interactúan específicamente con al menos una proteína diana o al menos un sustituto de proteínas objetivo.

45 El experto en la técnica entiende que, con las sondas de anticuerpo, la porción reactiva comprende típicamente el sitio de unión al antígeno y los residuos relacionados de la molécula de anticuerpo; y las secuencias diana comprenden la porción del analito que incluye el epítipo, independientemente de si tales secuencias son lineales, conformacionales o combinaciones de las mismas. El experto en la técnica apreciará que los complejos moleculares y al menos parte de los complejos moleculares descritos en el presente documento pueden detectarse individualmente mientras están atados o unidos a un sustrato o en solución, dependiendo, entre otras cosas, de la naturaleza del complejo molecular específico o componente escindible y la técnica SMD y el aparato de detección empleados.

50 Las técnicas de aislamiento de proteínas también son bien conocidas en la técnica y kits que emplean al menos algunas de estas técnicas están disponibles comercialmente. Las técnicas de aislamiento proteínico emplean típicamente uno o más de los siguientes: maceración y lisis celular, incluyendo métodos físicos, químicos y enzimáticos; centrifugación; separaciones por peso molecular, tales como cromatografía de exclusión por tamaño y electroforesis preparativa; precipitación selectiva, por ejemplo, procedimientos de retención salina y extracción por adición de sal; diversos



métodos cromatográficos; y similares. Descripciones detalladas y protocolos relevantes para las técnicas de purificación de proteínas pueden encontrarse en, entre otros lugares, Marchak et al., *Strategies for Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Press (1996); *Essentials from Cells: A Laboratory Manual*, D. Spector y R. Goldman, eds., Cold Spring Harbor Press (2003); R. Simpson, *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (2003); y D. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press (2002). También se pueden usar kits comercialmente disponibles, por ejemplo, pero sin limitarse a, ProteoExtract<sup>MR</sup>. Kits parciales de extracción de proteómica (P-PEK) y ProteoExtract<sup>MR</sup>. Los kits de extracción de proteoma completo (C-PEK), disponibles de CALBIOCHEM®, La Jolla, California. El experto en la técnica apreciará que los analitos de ácido nucleico para uso con las composiciones, métodos y kits de la invención pueden obtenerse fácilmente sin experimentación indebida usando tales técnicas de purificación y kits comerciales.

#### Métodos

La presente invención, según se describe en las reivindicaciones adjuntas, proporciona métodos para la detección y cuantificación de proteínas diana individuales en muestras biomoleculares. En particular, los métodos utilizan sondas de proteína que son capaces de unirse a proteínas diana individuales. Los métodos también utilizan nanoinformadores. A través de los códigos de marcadores de los nanoinformadores, la unión de las sondas de proteína a las proteínas objetivo da como resultado la identificación de las proteínas diana. También se proporcionan métodos para fabricar y usar tales sondas de proteína y/o nanoinformadores.

En particular, se proporcionan métodos para la detección y/o cuantificación de una proteína diana mediante la unión de una sonda de proteína a una proteína diana. Una sonda de proteínas comprende al menos una porción de reacción que permite que la sonda se una a, o interactúe con la proteína diana o un sustituto de proteína diana o combinaciones de los mismos; típicamente en una secuencia específica, una confirmación de manera específica, o ambos; por ejemplo, pero sin limitarse a, unión de antígeno-anticuerpo, unión de aptámero-diana, y similares.

Las sondas de proteína típicamente son parte de al menos un conjunto de sondas, que comprende al menos una primera sonda y al menos una segunda sonda. Por lo tanto, se proporcionan métodos para la detección y/o cuantificación de una proteína diana uniendo un conjunto de sondas de proteína a una proteína diana, donde el conjunto de sondas de proteína comprende una primera sonda de proteína y una segunda sonda de proteína. La primera sonda de proteína y la segunda sonda de proteína comprenden al menos una porción de reacción que permite que las sondas se unan o interactúen con diferentes regiones de la proteína diana o un sustituto de proteína diana o combinaciones de los mismos, por ejemplo, de una manera específica de secuencia, confirmación específica, o ambos.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria descriptiva comprenden además sondas de proteína que contienen una porción de identidad o al menos parte de una porción de identidad, por ejemplo, un oligo señal, un nanoinformador y/o oligo enlazador. La porción de identidad permite la identificación de la presencia o ausencia de la sonda o sondas de proteína unidas a la proteína diana en la etapa de detección de los métodos descritos en la presente memoria. Por lo tanto, en algunas realizaciones se proporcionan métodos para la detección y/o cuantificación de una proteína diana uniendo la sonda de proteína o conjunto de sondas de proteína a una proteína diana, donde la sonda de proteína o al menos una de las sondas de proteína en el conjunto de sonda contiene una porción de identidad (por ejemplo, un oligo señal, un nanoinformador y/o un oligo enlazador).

En algunas realizaciones, la porción de identidad es un oligo señal. Un oligo señal comprende una secuencia polinucleotídica. Cada sonda de proteína o conjunto de sondas de proteína tendrá un oligo señal específico y/o único en un ensayo, de manera que el oligo señal pueda estar asociado con la proteína diana. En ciertas realizaciones, el oligo señal comprende aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70 o más bases nucleotídicas. En una realización, el oligo señal comprende entre 40 y 120 bases, o entre 80 y 100 bases. En algunas realizaciones, el oligo señal es biotinilado y usado con una sonda de captura y un nanoinformador como se describe a continuación. El oligo señal puede unirse directa o indirectamente a la sonda de proteína. Los métodos para unir ácido nucleico a sondas de proteína son conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria. Los oligos señal pueden ser secuencias de ácido nucleico sintéticas diseñadas o una secuencia natural derivada de una fuente natural tal como una secuencia de genoma viral, bacteriófagos o genomas de animales.

En algunas realizaciones, el oligo señal se une indirectamente a una sonda de proteína a través de hibridación con un oligo enlazador unido a la sonda de proteína. Un oligo enlazador comprende una secuencia polinucleotídica. En las realizaciones en las que se utiliza un oligo enlazador, cada uno de los oligos enlazadores será específico y/o único para una sonda de proteína o conjunto de sondas de proteína en un ensayo de tal manera que la oligo señal complementario pueda estar asociado a la proteína diana. El oligo señal comprende una porción que es complementaria al oligo enlazador unido a la sonda de proteína. En algunas realizaciones, la porción complementaria del oligo señal es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70 o más bases nucleotídicas. En algunas realizaciones, la porción complementaria del oligo señal está en el intervalo de 10-25 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria del oligo señal está en el intervalo de 15-20 bases. En algunas realizaciones, la parte complementaria del oligo señal es de 40 bases. En algunas realizaciones, la parte complementaria del oligo señal es de 30 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria del oligo señal es

de 20 bases. El oligo enlazador puede ser una secuencia de ácido nucleico sintética diseñada o una secuencia natural derivada de una fuente natural tal como una secuencia de genoma viral, bacteriófagos o genomas de animales.

5 La figura 1 muestra una representación esquemática de una realización en la que se utiliza un oligo señal para la detección de la proteína diana. La realización representada en la Figura 1 se configura para separar la unión de la  
 10 proteína diana de la hibridación de los nanoinformadores. La Figura 1 en la etapa 1) muestra una primera sonda de proteína que comprende un oligo señal unido a la sonda a través de hibridación con un oligo enlazador; y una segunda proteína unida a un marcador de afinidad. En la realización representada en la Figura 1, las sondas de proteína son anticuerpos y el marcador de afinidad es biotina. Sin embargo, la realización representada en esta figura puede utilizar cualquiera de las sondas de proteína y los marcadores de afinidad descritos en la presente memoria. Tanto la primera  
 15 como la segunda sondas de proteína comprenden una región específica diana capaz de unirse a una o más porciones de una diana. En la etapa 2) y 3), la proteína diana se mezcla con la primera y segunda sondas de proteína. En la etapa 4), se purifica el complejo de las sondas de proteína y proteína diana. En el ejemplo representado en la Figura 1, el complejo de las sondas de proteína y proteína diana se purifica utilizando perlas magnéticas acopladas a estreptavidina, tales como Dynabeads® (Invitrogen). Sin embargo, en esta o en cualquier otra realización descrita aquí, el complejo de la proteína diana y la sonda o sondas de proteína pueden purificarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica tal como cromatografía, incluyendo pero sin limitarse a HPLC, FPLC, cromatografía de exclusión por tamaño (filtración en gel), cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de inmovilización de afinidad y cromatografía de fase inversa; unión ligando-receptor, tal como biotina-avidina, proteína de unión a maltosa-maltosa (MBP), péptido de unión calcio-calcio; unión aptámero-diana; hibridación  
 20 código postal; y similares.

En la etapa 5) de la Figura 1, el oligo señal se eluye del complejo de la proteína diana y de las sondas de proteína y se analiza usando nanoinformadores como se describe a continuación. Los métodos para eluir los oligos señal son conocidos en la técnica incluyendo los representados en la Figura 1 y descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los métodos representados en la Figura 1 se usan para detectar y/o cuantificar una pluralidad de proteínas diana. Cada proteína diana se detectará mediante un conjunto de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda como se describe en la Figura 1. Cada conjunto de sondas tendrá un oligo señal específico y/o único que puede estar asociado a la proteína diana de cada conjunto de sondas.

En algunas realizaciones, las sondas de proteína comprenden una región de captura. En algunas realizaciones, la región de captura se usa para el aislamiento de la sonda de proteína y/o inmovilización de la sonda de proteína en una superficie. La región de captura puede ser un marcador de afinidad como se describe a continuación o una superficie sólida tal como una perla, una lámina o una matriz.

La Figura 6 muestra una representación esquemática de una de las realizaciones de la invención. En esta realización, una sonda de proteína se une a una región de captura, por ejemplo, una perla magnética. La Figura 6 representa el uso de un anticuerpo. Sin embargo, la realización representada en esta figura puede utilizar cualquiera de las sondas de proteína y regiones de captura descritas en la presente memoria. Las sondas de proteína (por ejemplo, anticuerpos) se pueden unir a una región de captura mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica incluyendo los métodos descritos en la presente memoria. La proteína diana se mezcla con la sonda de proteína que contiene la región de captura. El complejo de la proteína diana y de la sonda de proteína se pone entonces en contacto con una segunda sonda de proteína unida a un oligo señal a través de un oligo enlazador. El complejo de la proteína diana y las sondas de proteína se purifican. En este ejemplo, el complejo de proteína diana y anticuerpo se purifica usando la perla magnética en el anticuerpo de captura. Sin embargo, en esta o cualquier otra realización descrita aquí, el complejo de la proteína diana y las sondas de proteína pueden purificarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como los métodos descritos anteriormente. Si la región de captura es una lámina o una matriz, el complejo de la proteína diana y las sondas de proteína se pueden purificar lavando el exceso de sondas de muestra y proteína no unidas. El complejo aislado de sondas de proteína/proteínas diana se lava entonces y se eluye el oligo señal. El oligo señal se analiza utilizando nanoinformadores como se describe a continuación. Los métodos para eluir los oligos señal son conocidos en la técnica incluyendo los métodos descritos en la presente memoria. En esta realización, las proteínas y los nanoinformadores están en gran parte separados, lo que elimina las preocupaciones sobre la adherencia de las proteínas. En algunas realizaciones, los métodos representados en la Figura 6 se usan para detectar y/o cuantificar una pluralidad de proteínas diana. Cada proteína diana se detectará mediante un conjunto de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda, como se describe en la Figura 6. Cada conjunto de sondas tendrá un oligo señal específico y/o único que puede estar asociado a la proteína diana de cada conjunto de sondas.

En algunas realizaciones, el oligo señal se une a un marcador de afinidad. El marcador de afinidad en el oligo señal puede usarse para aislar y/o inmovilizar el oligo señal. En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria utilizando un oligo señal, el oligo señal puede unirse a un marcador de afinidad.

La Figura 7 muestra una representación esquemática de una de las realizaciones de la descripción. Esta realización se puede usar con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. El diagrama en la Figura 7 muestra anticuerpos como sondas de proteína, sin embargo, este ejemplo se puede utilizar con cualquiera de las sondas de proteína descritas en la presente memoria. La Figura 7 muestra un anticuerpo unido directa o indirectamente (por ejemplo, mediante hibridación a través de un oligo) a una región de captura (por ejemplo, una perla magnética) y un segundo anticuerpo unido a un oligo señal biotinilado. Sin embargo, la realización representada en esta figura puede

utilizar cualquiera de las regiones de captura y los marcadores de afinidad descritos en la presente memoria. La proteína diana se mezcla con las sondas de proteína. El complejo de proteína diana y anticuerpos se purifica usando la perla magnética en el anticuerpo de captura. Sin embargo, en esta o cualquier otra realización descrita aquí, el complejo de la proteína diana y las sondas de proteína pueden purificarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como los métodos descritos anteriormente. Si la región de captura es una lámina o una matriz, el complejo de la proteína diana y las sondas de proteína se pueden purificar lavando el exceso de sondas de muestra y proteína no unidas. El complejo de proteína/anticuerpo diana aislado se lava y el oligo señal se eluye mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica incluyendo los descritos en la presente memoria. En la realización de la Figura 7, el oligo señal se purifica usando perlas acopladas a oligonucleótidos tales como Dynabeads®. Sin embargo, el oligo señal puede purificarse mediante cualquier método adecuado de acuerdo con el marcador de afinidad unido a él. El oligo señal se analiza utilizando nanoinformadores como se describe a continuación. En algunas realizaciones, los métodos representados en la Figura 7 se usan para detectar y/o cuantificar una pluralidad de proteínas diana. Cada proteína diana se detectará mediante un conjunto de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda, como se describe en la Figura 7. Cada conjunto de sondas tendrá un oligo señal específico y/o único que puede estar asociado a la proteína diana de cada conjunto de sondas. Las realizaciones descritas en la Figura 7 proporcionan la ventaja de que sólo requiere dos purificaciones con perlas. Además, en esta realización, las proteínas y los nanoinformadores están en gran parte separados, lo que elimina las preocupaciones sobre la adherencia de las proteínas.

En algunas realizaciones, el oligo señal se genera ligando dos oligos que están en estrecha proximidad, por ejemplo, ligación de proximidad. Un diagrama de ligación de proximidad se representa en la Figura 8. En la etapa 1) de la Figura 8, las sondas que contienen los oligos están diseñadas para unirse por pares a una proteína diana y formar un oligo señal por ligación cuando las sondas se colocan próximas entre sí. La Figura 8 muestra una realización que utiliza anticuerpos como sondas de proteína. Sin embargo, el método descrito en la Figura 8 puede usarse con cualquiera de las sondas de proteína descritas en la presente memoria. Las sondas que contienen los oligos pueden prepararse y purificarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos en Gullberg et al., PNAS 101 (22), páginas 8420-24 (2004). En la etapa 2) de la Figura 8, la proteína diana se mezcla a continuación con las sondas que contienen los oligos y los oligos puente.

Un oligo puente comprende una secuencia polinucleotídica. Los oligos unidos a sondas de proteína comprenden una porción que es complementaria al oligo puente. En algunas realizaciones, las porciones complementarias de los oligos son 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70 o más bases nucleotídicas. En algunas realizaciones las porciones complementarias del oligo puente con cada uno de los oligos unidos a la sonda de proteína son de 6 a 15 bases, con una longitud total de oligo puente de 12-30 bases. En algunas realizaciones, las porciones complementarias de los oligos son de 40 bases. En algunas realizaciones, las porciones complementarias de los oligos son de 30 bases. En algunas realizaciones, las porciones complementarias de los oligos son de 20 bases.

En la etapa 4) de la Figura 8, se añaden los componentes requeridos para la ligación de la sonda. Los oligos en las sondas de proteína pueden ligarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. La ligación comprende cualquier proceso enzimático o químico en el que se forma un enlace internucleotídico entre los extremos opuestos de las secuencias de ácido nucleico que se hibridan en forma adyacente al oligo puente. Ejemplo de enzimas que se pueden utilizar para la ligación incluyen, pero no se limitan a ADN ligasa, y ARN ligasa tales como ADN ligasa T4, ARN ligasa T4, ligasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN ligasa de *Thermus aquaticus* (Taq) o ligasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu). La ligación química puede realizarse usando agentes activadores y reductores tales como carbodiimida, bromuro de cianógeno (BrCN), imidazol, 1-metilimidazol/carbodiimida/cistamina, N-cianoimidazol, ditiotreitól (DTT) y luz ultravioleta. Pueden usarse técnicas de ligación tales como ligación de llenado de huecos, incluyendo, sin limitación, OLA y LCR de llenado de huecos, ligación de oligonucleótidos puente y ligación de corrección. Las descripciones de estas técnicas pueden encontrarse, entre otros lugares, en la patente estadounidense No. 5.185.243, las solicitudes de patente europea EP 320308 y EP 439182, y publicaciones PCT Nos. WO 90/01069 y WO 01/57268.

En la etapa 5) de la Figura 8, después de la ligación, el oligo señal se libera a continuación mediante reducción de disulfuro, escisión de uracilo, digestión de restricción, proteinasa K, o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Adicionalmente, el oligo señal puede ser liberado por los métodos representados en la Figura 8B-8D. La Figura 8B muestra una realización en la que el oligo señal tiene un marcador de afinidad tal como biotina o una secuencia. El marcador de afinidad puede usarse para aislar y/o inmovilizar el oligo señal como se describe en el presente documento. La Figura 8C muestra una realización en la que el oligo puente tiene un marcador de afinidad tal como biotina o una secuencia. El marcador de afinidad puede usarse para aislar y/o inmovilizar el oligo señal como se describe en el presente documento. Sólo el oligo ligado tendrá suficiente solapamiento para permanecer hibridado al oligo señal durante el proceso de aislamiento y/o inmovilización. La figura 8D muestra una realización en la que se combinan las realizaciones de las figuras 8B y 8C. El oligo señal se analiza utilizando nanoinformadores como se describe a continuación. En algunas realizaciones, los métodos representados en la Figura 8 se usan para detectar y/o cuantificar una pluralidad de proteínas diana. Cada proteína diana se detectará mediante un conjunto de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda como se describe en la Figura 8. Cada conjunto de sondas tendrá un oligo señal específico y/o único que puede estar asociado a la proteína diana de cada conjunto de sondas. Las realizaciones descritas en la Figura 8 tienen varios beneficios alrededor de la sensibilidad, minimización de la

reactividad cruzada y multiplexación. Las ligaciones de proximidad han mostrado una alta sensibilidad y tienen el efecto de reducir el Kd aparente disminuyendo esencialmente la tasa de desconexión.

En algunas realizaciones que utilizan ligación de proximidad, uno de los oligos está unido a un nanoinformador. La Figura 9 muestra un diagrama de una de tales realizaciones.

5 En la etapa 1) de la Figura 9, las sondas que contienen los oligos están diseñadas para unirse por pares a las proteínas diana. Uno de los oligos en una de las sondas de proteína está unido a un nanoinformador. La Figura 9 muestra una realización que utiliza anticuerpos como sondas de proteína. Sin embargo, el método descrito en la Figura 9 puede usarse con cualquiera de las sondas de proteína descritas en la presente memoria. Las sondas que contienen los oligos se pueden preparar y purificar como se ha descrito anteriormente. En la etapa 2) y 3) de la Figura 9, la proteína diana se mezcla entonces con las sondas que contienen los oligos y los oligos puente. El oligo puente se une al oligo en una primera sonda de proteína y una porción del nanoinformador unido a la segunda sonda de proteína.

10 El oligo unido a la primera sonda de proteína y el nanoinformador comprenden una parte que es complementaria al oligo puente. En algunas realizaciones la porción complementaria es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70 o más bases nucleotídicas. En algunas realizaciones, la parte complementaria es de 40 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 30 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 20 bases. En algunas realizaciones, las porciones complementarias del oligo puente con cada uno de los oligos unidos a la sonda de proteína y el nanoinformador son de 6 a 15 bases, con una longitud total de oligo puente de 12-30 bases. En la etapa 4) de la Figura 9, se añaden a continuación los componentes necesarios para la ligación de la sonda. El oligo en la primera sonda de proteína y el nanoinformador pueden ligarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica tal como se ha descrito anteriormente. En la etapa 5) de la Figura 9, después de la ligación, el oligo señal puede liberarse opcionalmente mediante reducción de disulfuro, escisión de uracilo, digestión de restricción, proteinasa K, o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica.

15 Además, el oligo señal puede ser liberado por los métodos representados en las figuras 8B-8D. Por ejemplo, usando el enfoque descrito en la Figura 8C, se lleva a cabo una etapa de purificación para separar los oligos ligados de los oligos no ligados después de la liberación del oligo señal, por ejemplo, de un anticuerpo. Esta etapa de purificación puede realizarse utilizando perlas magnéticas o cualquier otro método conocido en la técnica para la separación física de proteínas. Es importante destacar que, si la cantidad de anticuerpo usada es mayor que la cantidad de informadores usados, entonces el exceso resultante de oligos no ligados puede bloquear la hibridación del informador con el oligo. Como se describe en el Ejemplo 7, la etapa de purificación incluye además una etapa de enjuague con una solución reguladora. La Figura 13 demuestra cómo varios componentes de un complejo informador de anticuerpos se purifican y enjuagan en una variedad de condiciones del regulador. Un regulador de enjuague preferido es SSPE; sin embargo, otros reguladores y todas las concentraciones que tienen capacidades similares para retener los recuentos de un complejo informador o un componente de los mismos están abarcados por estos métodos.

20 El oligo señal se analiza usando nanoinformadores como se describe a continuación. En algunas realizaciones, los métodos representados en la Figura 9 se usan para detectar y/o cuantificar una pluralidad de proteínas diana. Cada proteína diana se detectará mediante un conjunto de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda, como se describe en la Figura 9. Cada conjunto de sondas tendrá un oligo señal específico y/o único que puede estar asociado a la proteína diana de cada conjunto de sondas. Las realizaciones descritas en la Figura 9 aprovechan la disminución en el Kde pérdida mediante ligación de proximidad. Un Kde pérdida más bajo significa un Kd más bajo y la capacidad de trabajar con concentraciones más bajas de sonda de proteína. Esta disminución en Kd hace que sea más fácil trabajar en concentraciones requeridas para los informadores y, por lo tanto, contemplar enfoques de detección directa para el análisis de multiplex y menores costos de reactivos. Estas realizaciones no necesitan una etapa para la hibridación con los informadores dentro del ensayo. Por lo tanto, estos ensayos serán más rápidos y tendrán un tiempo más corto para responder.

25 En algunas realizaciones, el oligo señal se analiza/detecta usando un nanoinformador o nanoinformadores como se describe en las secciones siguientes. En estas realizaciones, el nanoinformador o nanoinformadores comprenden una porción que es complementaria al oligo señal. En algunas realizaciones la porción complementaria es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70 o más bases nucleotídicas. En algunas realizaciones, la parte complementaria es de 40 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 30 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 20 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 15-20 bases.

30 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además sondas de proteína que contienen un nanoinformador. Por lo tanto, se proporcionan métodos para la detección y/o cuantificación de una proteína diana uniendo una sonda de proteína o conjunto de sondas de proteína a una proteína diana, en la que la sonda de proteína o al menos una de las sondas de proteína en el conjunto de sonda contiene un nanoinformador.

35 La Figura 4 muestra un diagrama esquemático de una de las realizaciones de la descripción. En esta realización, un nanoinformador está unido a uno de los anticuerpos. Los métodos descritos en la Figura 4 pueden utilizarse usando cualquiera de las sondas de proteína descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el nanoinformador

5 puede unirse directamente a la sonda de proteína. En otras realizaciones, el nanoinformador puede unirse a una sonda de proteína mediante hibridación a través de un oligo enlazador. De este modo, el nanoinformador comprende una parte que es complementaria del oligo enlazador en la sonda de proteína. En algunas realizaciones la porción complementaria es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70 o más bases nucleotídicas. En algunas realizaciones, el oligo enlazador es de 15-20 bases. En algunas realizaciones, la parte complementaria es de 40 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 30 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 20 bases. En algunas realizaciones, la porción complementaria es de 15 bases.

10 La hibridación del nanoinformador con el oligo enlazador puede producirse a diferentes temperaturas dependiendo de la longitud de la porción complementaria. En algunas realizaciones, el nanoinformador puede hibridarse con un oligo enlazador unido a una sonda de proteína a una temperatura en el intervalo de 32°C a 40°C. En algunas realizaciones, el nanoinformador puede hibridarse con un oligo enlazador unido a una sonda de proteína a una temperatura de 35°C. En algunas realizaciones, el nanoinformador puede hibridarse con un oligo enlazador unido a una sonda de proteína a una temperatura de 37°C. En algunas realizaciones, el nanoinformador puede hibridarse con un oligo enlazador unido a una sonda de proteína a una temperatura de 45°C. En algunas realizaciones, el nanoinformador puede hibridarse con un oligo enlazador unido a una sonda de proteína a una temperatura de 52-57°C. En algunas realizaciones, el nanoinformador puede hibridarse con un oligo enlazador unido a una sonda de proteína a una temperatura de 15-20°C por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de las porciones complementarias del nanoinformador con el oligo enlazador. Un experto en la técnica comprenderá que la longitud de las porciones complementarias del nanoinformador con el oligo enlazador y su temperatura de hibridación dependerán del tipo de sonda de proteína utilizada. En algunas realizaciones, la sonda de proteína es un anticuerpo y la longitud de las porciones complementarias del nanoinformador con el oligo enlazador es de 15-20 bases, lo que produce una  $T_m$  de aproximadamente 57°C o 15-20°C por encima de la temperatura ideal del anticuerpo de 37°C. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la sonda de proteína es un anticuerpo, la longitud de las porciones complementarias del nanoinformador con el oligo enlazador es de 15-20 bases y la temperatura de hibridación es de 37°C.

La Figura 4 muestra que se forma un complejo de proteína diana y anticuerpos en el que uno de los anticuerpos está unido a biotina y el otro anticuerpo tiene un nanoinformador unido. Los métodos descritos en la Figura 4 pueden usar cualquier marcador de afinidad descrito en este documento además de la biotina. La purificación del complejo proteína diana-anticuerpos puede realizarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica incluyendo los descritos en la presente memoria. La elución del nanoinformador puede conseguirse por fusión de perlas G y F, mediante digestión o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. En las realizaciones en las que el complejo de anticuerpos proteicos contiene un marcador de afinidad, el complejo puede unirse a un cubreobjetos, por ejemplo, recubierto con estreptavidina (Optichem®, Accelrys Technology Corporation). El nanoinformador se analiza como se describe a continuación. En algunas realizaciones, los métodos representados en la Figura 4 se usan para detectar y/o cuantificar una pluralidad de proteínas diana. Cada proteína diana se detectará mediante un conjunto de sondas que comprende una primera sonda y una segunda sonda, tal como se describe en la Figura 4. Cada conjunto de sondas tendrá un nanoinformador específico y/o único que puede estar asociado a la proteína diana de cada conjunto de sondas.

40 Sin tener la intención de limitarse a ninguna teoría o realizaciones específicas, las realizaciones de las invenciones que utilizan un oligo señal presentan varias ventajas: (1) estas realizaciones separan las proteínas diana y las sondas de proteína de los nanoinformadores. La separación de las proteínas de los informadores elimina los posibles problemas de solubilidad y adherencia asociados con el uso de nanoinformadores para medir las proteínas. La separación de las proteínas diana de los nanoinformadores evita los problemas de desajuste de  $K_d$  entre el ADN y las proteínas, permite el uso de concentraciones ideales para obtener tanto la máxima señal como el menor ruido, y permite el uso de anticuerpos de  $K_d$  bajo si es necesario; (2) el enfoque de oligo señal indirecto puede ejecutarse como un proceso posterior al ensayo del nanoinformador descrito a continuación, aprovechando de este modo un ensayo de nanoinformador optimizado; (3) se pueden usar conjuntos de sondas de proteína (por ejemplo, pares de anticuerpos) en su configuración normal si es necesario, por ejemplo, anticuerpo de captura en superficie (sobre una perla magnética, por ejemplo) y anticuerpo de detección en solución. Algunos anticuerpos funcionan mejor en esta configuración; (4) con estas realizaciones se minimizan los problemas asociados con las sondas de proteína que salen del objetivo (tasa de pérdida), por ejemplo, los anticuerpos sólo tienen que permanecer unidos al objetivo durante la unión y purificación sobre las perlas. Esto permite el uso de una amplia gama de anticuerpos incluyendo anticuerpos con menor afinidad de unión; y (5) las proteínas se pueden leer en el mismo carril que los ácidos nucleicos, por ejemplo, ARN o ADN. La muestra se divide primero: parte se ejecuta a través de las realizaciones de detección de proteínas descritas en la presente memoria (las células lisadas con detergente se unen y purifican como se describe en el presente documento) y parte se separa y se procesa como muestras de ácido nucleico (las células se lisan con GITC). Las muestras son luego recombinadas y analizadas usando nanoinformadores como se describe a continuación, potencialmente en el mismo carril. La medición tanto de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN) como de proteínas en el mismo carril minimizará las diferencias de medición, hará que los datos de expresión de proteína y ácido nucleico sean más comparables y eliminará la necesidad de múltiples métodos de medición para obtener los datos requeridos.

60 En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento proporcionan la medición de ácidos nucleicos, por ejemplo, ARN o ADN, en combinación con la medición de proteínas.

Cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento puede usarse en la detección de múltiples proteínas diana. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos que comprenden sondas de proteína para el análisis de proteínas diana. En algunas realizaciones, se proporciona una población de sondas de proteína para su uso en un ensayo multiplexado. Cada sonda de proteína en la población es específica para una molécula diana. La unión de las proteínas diana a las sondas de proteína se detecta entonces usando nanoinformadores. Cada nanoinformador comprende un código de marcación único que puede estar asociado a una molécula diana específica como se describe a continuación.

En algunas realizaciones, la detección de los nanoinformadores como se describe a continuación es de naturaleza digital ya que se cuenta una molécula a la vez. Aunque se utiliza fluorescencia para leer el código, las señales son altas y el punto está presente o no, por lo tanto, la detección digital. El uso de la detección digital en lugar de una señal fluorescente analógica utilizada para cuantificar la señal, conduce a una cuantificación más precisa. Por lo tanto, los métodos descritos en este documento permiten multiplexar hasta niveles más allá de lo que es posible actualmente, para una cuantificación más precisa y, posiblemente, una mayor sensibilidad.

#### Nanoinformadores

Un nanoinformador que proporciona un código de señales (el código de marcación del nanoinformador) asociado con un objetivo específico. En algunas realizaciones, tras unirse el nanoinformador a un oligo señal o un oligo de enlace asociado con una sonda de proteína, el código del nanoinformador identifica el oligo señal o la sonda de proteína a la que está unido el nanoinformador. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los nanoinformadores comprenden dos porciones principales: (i) una secuencia específica para una señal específica del oligo o un oligo asociado con una sonda de proteína; y (ii) un nanoinformador marcado. En algunas realizaciones, los nanoinformadores se unen directamente a una sonda de proteína.

Los nanoinformadores son estructuras modulares. En algunas realizaciones, el nanoinformador comprende una pluralidad de moléculas detectables diferentes. En algunas realizaciones, un nanoinformador marcado es una fracción molecular que contiene ciertos elementos básicos: (i) una pluralidad de regiones de unión de marcadores unidas en combinación lineal, y (ii) secuencias complementarias de polinucleótidos unidas a las regiones de unión del marcador de la cadena principal. En algunas realizaciones, el nanoinformador marcado comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más regiones únicas de unión de marcadores unidas en una combinación lineal, y secuencias complementarias de polinucleótidos unidas a las regiones de unión a marcadores de la cadena principal. En algunas realizaciones, el nanoinformador marcado comprende 3 o más regiones de fijación de marcadores unidas en combinación lineal, y secuencias complementarias de polinucleótidos unidas a las regiones de unión de marcadores de la cadena principal. El término región de unión al marcador incluye una región de secuencia polinucleotídica definida dentro de una columna principal dada que puede servir como un punto de unión individual para una molécula detectable.

La pluralidad de regiones de unión del marcador unidas en combinación lineal, pueden comprender secuencias diseñadas de forma única. Además, la pluralidad de regiones de unión a marcadores unidas en combinación lineal en los nanoinformadores puede comprender al menos una plantilla, por ejemplo, pero no limitada a, al menos una secuencia de ácido nucleico, tal como al menos parte de un genoma viral lineal o linealizable, tal como los genomas de adenovirus, virus de la hepatitis, virus del herpes, rotavirus y similares, o bacteriófagos tales como bacteriófagos lambda, M13,  $\phi$ X-174, de la serie T y similares, incluyendo derivados de los mismos que comprenden casetes de clonación, polienlazadores y similares; plásmidos, tales como plásmidos de la serie pBR322 y pUC, etc., incluyendo derivados de los mismos que comprenden casetes de clonación, polienlazadores, y similares; plantillas sintéticas; plantillas que comprenden secuencias artificiales; y similares. El experto en la técnica comprenderá que prácticamente cualquier pieza de ácido nucleico puede servir como plantilla para fabricar un nanoinformador siempre que sea lo suficientemente grande para incluir al menos dos regiones de unión de marcadores, o pueda combinarse con al menos otra secuencia de ácido nucleico de manera que la secuencia combinada sea lo suficientemente grande para incluir al menos dos regiones de unión del marcador.

En algunas realizaciones, el nanoinformador marcado comprende también una cadena principal que contiene una región constante. La región constante puede estar directa o indirectamente unida al nanoinformador. Por lo tanto, la región constante puede unirse covalentemente a un nanoinformador o la región constante puede unirse al nanoinformador más adelante en el ensayo. El término región constante incluye secuencias repetidas en tándem de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 25 nucleótidos. La región constante puede estar unida tanto a la región 5' como a la región 3' de un nanoinformador, y puede ser utilizada para la captura e inmovilización de un nanoinformador para la formación de imágenes o la detección, tal como mediante la unión a un sustrato sólido de una secuencia que es complementaria a la región constante.

Los elementos de un nanoinformador pueden encontrarse en una sola fracción molecular (un nanoinformador singular), o dos fracciones moleculares distintas (un nanoinformador dual). Cada fracción molecular puede estar compuesta de una molécula o más de una molécula unidas entre sí por medios covalentes o no covalentes. En algunas realizaciones, cada componente de un nanoinformador dual tiene una secuencia específica del oligo señal que se une a un sitio diferente en la misma molécula de oligo señal. Cuando se utiliza un sistema de nanoinformador dual, una de las sondas nanoinformadoras puede no estar marcada. En algunas realizaciones, la sonda nanoinformadora no marcada puede comprender una región de captura. En algunas realizaciones, la sonda nanoinformadora no marcada puede comprender

una región específica de oligo señal y una cadena principal que puede ser de cadena sencilla. En algunas realizaciones, la sonda nanoinformadora no marcada puede comprender una región específica del oligo señal y una cadena principal que puede ser de doble cadena.

5 Las secuencias complementarias de polinucleótidos unidas a una cadena principal de nanoinformador sirven para unir moléculas detectables, o monómeros marcadores, a la cadena principal del nanoinformador. Las secuencias complementarias de polinucleótidos pueden marcarse directamente, por ejemplo, mediante la incorporación covalente de una o más moléculas detectables en la secuencia complementaria de polinucleótidos. Alternativamente, las secuencias complementarias de polinucleótidos pueden marcarse indirectamente, tal como mediante la incorporación de biotina u otra molécula capaz de una interacción específica del ligando en la secuencia complementaria de polinucleótidos. En tales casos, el ligando (por ejemplo, estreptavidina en el caso de incorporación de biotina en la secuencia complementaria de polinucleótidos) puede unirse covalentemente a la molécula detectable. Cuando las moléculas detectables unidas a una región de unión al marcador no se incorporan directamente en la secuencia complementaria de polinucleótidos, esta secuencia sirve como un puente entre la molécula detectable y la región de unión al marcador, y puede denominarse como una molécula puente, por ejemplo, un ácido nucleico. Los nanoinformadores se describen en la patente estadounidense No. 7.473.767; solicitudes de patente estadounidenses Nos. 10/542.458; 12/324.357; 11/645.270 y 12/541.131.

El nanoinformador con base en ácido nucleico, los complejos de oligo señal-nanoinformador o los complejos de sonda de nanoinformador-proteína descritos en el presente documento comprenden ácidos nucleicos, que pueden purificarse o inmovilizarse por afinidad utilizando un ácido nucleico, tal como un oligonucleótido, que es complementario a la región constante del nanoinformador. Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones los nanoinformadores comprenden al menos una región constante, que puede servir como marcador de afinidad para purificación y/o para inmovilización (por ejemplo, a una superficie sólida). La región constante comprende típicamente dos o más regiones repetidas en tándem de nucleótidos repetidos, tales como una serie de repeticiones de 15 bases. En tales ejemplos de realizaciones, el nanoinformador, ya sea complejo con un oligo señal, una molécula diana o de otro modo, puede purificarse o inmovilizarse mediante un reactivo de afinidad recubierto con un oligonucleótido de 15 bases que es el complemento inverso de la unidad de repetición.

Los nanoinformadores, los complejos de nanoinformador-oligo señal o los complejos de nanoinformador-sonda de proteína se pueden purificar en dos o más etapas de selección de afinidad. Por ejemplo, en las realizaciones en las que el nanoinformador está unido a una sonda de proteína, el nanoinformador puede comprender un marcador de afinidad. En otras realizaciones, cuando se usan un oligo señal y nanoinformadores dobles, una sonda de nanoinformador puede comprender un primer marcador de afinidad y la otra sonda de nanoinformador puede comprender un segundo marcador de afinidad (diferente). Las sondas nanoinformadoras se mezclan con los oligos señal, y los complejos que comprenden las dos sondas de los nanoinformadores duales se separan de materiales no unidos (por ejemplo, el oligo señal o las sondas individuales del nanoinformador) por purificación por afinidad contra uno o ambos marcadores de afinidad individuales. En la primera etapa, la mezcla puede unirse a un reactivo de afinidad para el primer marcador de afinidad, de manera que sólo se purifican sondas que comprenden el primer marcador de afinidad y los complejos deseados. Los materiales unidos se liberan del primer reactivo de afinidad y opcionalmente se unen a un reactivo de afinidad para el segundo marcador de afinidad, permitiendo la separación de complejos de sondas nanoinformadoras que comprenden el primer marcador de afinidad. En este punto sólo se unirían los complejos completos. Los complejos se liberan finalmente del reactivo de afinidad para el segundo marcador de afinidad y luego se estira y se forman imágenes preferiblemente. El reactivo de afinidad puede ser cualquier superficie sólida recubierta con un compañero de unión para el marcador de afinidad, tal como una columna, perla (por ejemplo, látex o perla magnética) o una lámina recubierta con el compañero de unión. Los nanoinformadores de inmovilización y estiramiento usando reactivos de afinidad se describen completamente en la solicitud provisional estadounidense No. 60/753.816 de Sean M. Ferree y Dwayne L. Dunaway, titulada "Compositions Comprising Oriented, Immobilized Macromolecules and Methods for Their Preparation", presentada el 23 de diciembre de 2005, y la patente estadounidense No. 7.473.767; las solicitudes de patente estadounidenses Nos. 10/542.458; 12/324.357; 11/645.270 y 12/541.131.

La secuencia de señales proporcionada por los monómeros del marcador asociados con las diversas regiones de unión del marcador de la cadena principal de un nanoinformador dado permite la identificación única del nanoinformador. Por ejemplo, cuando se usan marcadores fluorescentes, un nanoinformador que tiene una identidad única o una firma espectral única está asociado con una secuencia específica de oligo señal o una sonda de proteína que reconoce una molécula diana específica o una parte de la misma. La detección de la señal nanoinformadora, tal como el código espectral de un nanoinformador marcado de forma fluorescente, asociado con el nanoinformador, permite detectar la presencia de la molécula diana en la mezcla (análisis cualitativo). El recuento de todos los monómeros marcadores asociados con un código o firma espectral dado permite el recuento de todas las moléculas de la mezcla asociadas con la secuencia específica del oligo o la sonda de proteína acoplada al nanoinformador (análisis cuantitativo). En las realizaciones en las que se usa un oligo señal, los oligos señal pueden estar correlacionados con la molécula diana a través de la unión de la molécula diana a la sonda de proteína asociada con el oligo señal. Por lo tanto, los nanoinformadores son útiles para el diagnóstico o pronóstico de diferentes estados biológicos (por ejemplo, enfermedad frente a estado sano) mediante análisis cuantitativo de marcadores biológicos conocidos.

Además, la sensibilidad exquisita de detección y cuantificación de una sola molécula proporcionada por los nanoinformadores permite la identificación de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico, incluidos aquellos cuyas

fluctuaciones entre los diferentes estados biológicos son demasiado pequeñas, detectan una correlación con un estado biológico particular usando métodos moleculares tradicionales. La sensibilidad de la detección molecular basada en nanoinformadores permite un análisis farmacocinético detallado de agentes terapéuticos y de diagnóstico en pequeñas muestras biológicas.

- 5 Las síntesis de nanoinformadores se pueden realizar por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Ejemplos de síntesis de nanoinformadores se describen en la patente estadounidense No. 7.473.767; las solicitudes de patente estadounidenses Nos. 10/542.458; 12/324.357; 11/645.270 y 12/541.131.

10 En una realización, se proporciona un nanoinformador que comprende además un marcador de afinidad unido a la cadena principal de nanoinformador, de tal manera que la unión del marcador de afinidad a un soporte permite el estiramiento y resolución de la cadena principal de las señales proporcionadas por monómeros marcadores que corresponden a diferentes regiones de unión de marcadores en la cadena principal. El estiramiento del nanoinformador puede implicar cualquier medio de estiramiento conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, medios que implican medios físicos, hidrodinámicos o eléctricos. El marcador de afinidad puede comprender una región constante.

15 La singularidad de cada sonda nanoinformadora en una población de sondas permite el análisis multiplexado de una pluralidad de moléculas diana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cada sonda de nanoinformador puede contener seis regiones de unión del marcador, en las que cada región de unión del marcador de cada cadena principal es diferente de las otras regiones de unión del marcador en esa misma cadena principal. Si las regiones de unión del marcador van a ser marcadas con uno de cuatro colores y hay 24 posibles secuencias únicas para las regiones de unión del marcador y cada región de unión del marcador tiene un color específico, cada región de unión del marcador  
20 en cada estructura estará constituida por una de cuatro secuencias. Habrá 4.096 nanoinformadores posibles en este ejemplo. El número de nanoinformadores posibles puede aumentarse, por ejemplo, aumentando el número de colores, aumentando el número de secuencias únicas para las regiones de unión del marcador y/o aumentando el número de regiones de unión del marcador por cadena principal. Del mismo modo, el número de nanoinformadores posibles puede disminuirse disminuyendo el número de colores, disminuyendo el número de secuencias únicas para las regiones de unión del marcador y/o disminuyendo el número de regiones de unión del marcador por cadena principal.

En ciertas realizaciones, los métodos de detección se realizan en ensayos multiplex, con lo que se detecta una pluralidad de moléculas diana en el mismo ensayo (una única mezcla de reacción). En una realización preferida, el ensayo es un ensayo de hibridación en el que la pluralidad de moléculas diana se detecta simultáneamente. En ciertas realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas en el mismo ensayo es, al menos 2, al menos 5 moléculas diana diferentes, al menos 10 moléculas diana diferentes, al menos 20 moléculas diana diferentes, al menos 50 moléculas diana diferentes, al menos 75 moléculas diana diferentes, al menos 100 moléculas diana diferentes, al menos 200 moléculas diana diferentes, al menos 500 moléculas diana diferentes, o al menos 750 moléculas diana diferentes, o al menos 1.000 moléculas diana diferentes. En otras realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas en el mismo ensayo es de hasta 50 moléculas diana diferentes, hasta 100 moléculas diana diferentes, hasta 150 moléculas diana diferentes, hasta 200 moléculas diana diferentes, hasta 300 moléculas diana diferentes, hasta 500 moléculas diana diferentes, hasta 750 moléculas diana diferentes, hasta 1.000 moléculas diana diferentes, hasta 2.000 moléculas diana, o hasta 5.000 moléculas diana. En otras realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas es cualquier intervalo entre los números anteriores de diferentes moléculas diana, tales como, pero sin limitarse a, de 20 a 50 moléculas diana diferentes, de 50 a 200 moléculas diana diferentes, de 100 a 1.000 moléculas diana diferentes, de 500 a 5.000 moléculas diana diferentes, y así sucesivamente, etc.

Además de las capacidades analíticas cualitativas proporcionadas por los nanoinformadores y las técnicas analíticas basadas en las mismas, los nanoinformadores son únicamente adecuados para realizar análisis cuantitativos. Proporcionando una unión uno a uno entre los nanoinformadores (ya sean nanoinformadores singulares o dobles) y sus moléculas diana en una muestra biomolecular, se puede identificar y contar toda o una parte representativa de las moléculas diana presentes en la muestra. Este conteo individual de las diversas especies moleculares proporciona un método preciso y directo para determinar la concentración absoluta o relativa de la molécula diana en la muestra biomolecular. Además, la capacidad para dirigir cada molécula en una mezcla aprovecha individualmente los beneficios de la miniaturización incluyendo alta sensibilidad, requerimientos mínimos de cantidad de muestra, altas velocidades de reacción que son proporcionadas por la cinética de la fase de disolución en un pequeño volumen y, en última instancia, costos muy bajos de reactivos.

#### Moléculas detectables o monómeros marcadores

Los nanoinformadores pueden marcarse con cualquiera de una variedad de monómeros marcadores, tales como un radioisótopo, fluorocromo, colorante, enzima, nanopartícula, marcador quimioluminiscente, biotina u otro monómero conocido en la técnica que pueda detectarse directamente (por ejemplo, por emisión de luz) o indirectamente (por ejemplo, por unión de un anticuerpo marcado en forma fluorescente). Generalmente, una o más de las regiones de unión del marcador en el nanoinformador está marcada con uno o más monómeros marcadores y las señales proporcionadas por los monómeros marcadores unidas a las regiones de unión del marcador de un nanoinformador constituyen un código detectable que identifica el objetivo al que se une la región específica del objetivo del nanoinformador. En ciertas realizaciones, la falta de una señal dada de la región de unión del marcador (por ejemplo, un punto oscuro) también puede constituir parte del código del nanoinformador.



El ejemplo de monómeros marcadores que pueden usarse con los nanoinformadores descritos en la presente memoria y los métodos para incorporar los monómeros marcadores en los nanoinformadores se describen en la patente estadounidense No. 7.473.767; solicitudes de patente estadounidenses Nos. 10/542.458; 12/324.357; 11/645.270 y 12/541.131.

#### 5 Marcadores de afinidad

Se puede usar una variedad de marcadores de afinidad conocidos en la técnica, por ejemplo, para purificar y/o inmovilizar nanoinformadores. En algunas realizaciones, se une un ancla de biotina al nanoinformador, lo que permite la inmovilización del nanoinformador en una lámina recubierta con estreptavidina.

10 En algunas realizaciones, un nanoinformador marcado contendrá un marcador de afinidad en cada extremo, A1 y A2. El nanoinformador marcado puede inmovilizarse en una superficie a través de la unión de A1 a un compañero de afinidad inmovilizado. En ausencia de un compañero de unión de afinidad para A2, el extremo A2 del nanoinformador permanece en solución, pero en presencia de un compañero de unión de afinidad (A2'), el extremo A2 del nanoinformador también se inmoviliza. En algunas realizaciones, un nanoinformador marcado contendrá un solo marcador de afinidad, A1. Otro marcador de afinidad, A2, se puede unir al nanoinformador mediante unión directa del nanoinformador a una molécula que contiene A2 (por ejemplo, si el nanoinformador es o comprende un ácido nucleico, puede hibridar directamente con otro ácido nucleico al que está unido A2). Alternativamente, cualquier marcador de afinidad se puede unir al nanoinformador marcado a través de una molécula puente, tal como el ácido nucleico puente. En algunas realizaciones, tras la inmovilización de A1, el nanoinformador puede ser estirado, o "alargado", por ejemplo, por electroestiramiento, para la separación de las regiones de unión del marcador de una manera que permita la detección del código nanoinformador. Opcionalmente, mientras que el nanoinformador está en un estado alargado, se introduce A2 y se une el extremo del nanoinformador que es complementario de A2 hasta la superficie.

En algunas realizaciones, un marcador de afinidad se une a una sonda de proteína, por ejemplo, para purificar y/o inmovilizar la sonda de proteína.

25 Se puede usar un marcador de afinidad para unión a perlas u otras matrices para una variedad de aplicaciones útiles incluyendo, pero sin limitarse a, purificación.

Ejemplos de marcadores de afinidad y métodos de fabricación y/o unión de los mismos a los nanoinformadores descritos en la presente memoria se describen en la patente estadounidense No. 7.473.767; las solicitudes de patente estadounidenses Nos. 10/542.458; 12/324.357; 11/645.270 y 12/541.131.

#### Muestras biomoleculares

30 La sonda de proteínas y los sistemas nanoinformadores pueden usarse para detectar proteínas diana en cualquier muestra biomolecular. Como se apreciará por los expertos en la técnica, la muestra puede comprender cualquier cantidad de cosas, incluyendo, pero sin limitarse a: muestras biológicas, tales como células (incluyendo células primarias y líneas celulares cultivadas), lisados celulares o extractos, tejidos y extractos de tejidos; fluidos corporales (incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, orina, suero, linfa, bilis, líquido cefalorraquídeo, fluidos intersticiales, humor acuoso o vítreo, calostro, esputo, líquido amniótico, saliva, secreciones anales y vaginales, transpiración y semen, una secreción de sangre, sangre, orina, suero, linfa, bilis, líquido cefalorraquídeo, un trasudado, un exudado (por ejemplo, líquido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación) o líquido 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 virtualmente cualquier organismo, prefiriéndose muestras de mamíferos y siendo particularmente preferidas las muestras humanas, muestras ambientales (incluyendo, pero no limitadas a muestras de aire, agrícolas, de agua y suelo), muestras de agentes de guerra biológica, muestras de investigación incluyendo fluidos extracelulares, sobrenadantes extracelulares de cultivos celulares, cuerpos de inclusión en bacterias, compartimentos celulares, periplasma celular, compartimento mitocondrial, etc.

45 Las muestras biomoleculares pueden derivarse indirectamente de especímenes biológicos. Por ejemplo, cuando la proteína diana de interés es una quinasa, la muestra biomolecular puede ser una muestra que contiene proteínas aisladas de un lisado celular. En otro ejemplo, la muestra biomolecular se genera sometiendo una muestra biológica a fraccionamiento, por ejemplo, fraccionamiento de tamaño o fraccionamiento de membrana.

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

Las muestras biomoleculares también pueden incluir muestras ambientales, tales como aquellas que contienen bacterias u otros organismos, tales como diatomeas, dinoflagelados, algas, entre otras, como en ciertas muestras marinas o terrestres.

#### Detección de nanoinformadores

Los nanoinformadores se detectan por cualquier medio disponible en la técnica que sea capaz de detectar las señales específicas en un nanoinformador dado. Cuando el nanoinformador está marcado de forma fluorescente, puede investigarse la consideración adecuada de las fuentes de excitación apropiadas. Las fuentes posibles pueden incluir, pero no se limitan a, lámpara de arco, lámpara de xenón, láseres, diodos emisores de luz o alguna combinación de los mismos. La fuente de excitación apropiada se utiliza conjuntamente con un sistema de detección óptica apropiado, por ejemplo, un microscopio fluorescente invertido, un microscopio epifluorescente o un microscopio confocal. Preferiblemente, se utiliza un microscopio que puede permitir la detección con suficiente resolución espacial para determinar la secuencia de las manchas en el nanoinformador. Por ejemplo, en una realización se puede obtener una imagen de un nanoinformador dual hibridado con una molécula diana. Si, por ejemplo, los nanoinformadores están marcados con tres colores diferentes, Alexa 488, Cy3 y Alexa 647 (marcados 1, 2 y 3, respectivamente). Los colores 1, 2 y 3 se adquieren cada uno en diferentes canales y los primeros y segundos registros, que pueden ser vistos como filas de puntos, son desplazados por varios píxeles para poder mostrar cada registro individualmente.

Ejemplos de métodos para la detección de nanoinformadores que pueden usarse en los métodos de la invención y en la descripción se describen en la patente estadounidense No. 7.473.767 titulada "Methods for detection and quantification of analytes in complex mixtures", la publicación de la patente estadounidense No. 2007/0166708 titulada "Methods for detection and quantification of analytes in complex mixtures", la solicitud de patente estadounidense No. 11/645.270 titulada "Compositions comprising oriented, immobilized macromolecules and methods for their preparation", la solicitud PCT No. US06/049274 titulada "Nanoreporters and methods of manufacturing and use thereof", y la solicitud provisional de patente estadounidense No. 60/088.988 titulada "Stable nanoreporter".

Aplicaciones para la detección de proteínas a través de la tecnología de nanoinformadores

Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para el diagnóstico, pronóstico, terapéutica, estratificación del paciente, desarrollo de fármacos, selección del tratamiento y propósitos de selección. Ventajosamente, se pueden analizar muchas proteínas diana diferentes de una sola 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.

La composición y los métodos se pueden usar en proteómica. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan típicamente una respuesta rápida que es muy deseable para esta aplicación. Los métodos y la composición descritos en el presente documento pueden usarse en el proceso de encontrar biomarcadores que pueden usarse para diagnósticos o pronósticos y como indicadores de salud y enfermedad. Los métodos y la composición descritos en la presente memoria pueden usarse para cribar fármacos, por ejemplo, desarrollo de fármacos, selección de tratamiento, determinación de la eficacia del tratamiento y/o identificación de objetivos para el desarrollo farmacéutico. La capacidad de probar la expresión de la proteína en los ensayos de detección que implican fármacos es muy importante porque las proteínas son el producto génico final en el cuerpo. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en el presente documento medirán tanto la proteína como la expresión génica simultáneamente, lo que proporcionará la mayor información con respecto al examen particular que se está realizando.

Los presentes métodos pueden aplicarse al análisis de muestras biomoleculares obtenidas o derivadas de un paciente para determinar si está presente un tipo de célula enferma en la muestra, la etapa de la enfermedad, el pronóstico para el paciente, la capacidad del paciente para responder a un tratamiento particular, o el mejor tratamiento para el paciente. Los presentes métodos también se pueden aplicar a biomarcadores identificados para una enfermedad particular.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan en el diagnóstico de una afección. Tal como se utiliza aquí, el término "diagnosticar" o "diagnóstico" de una afección incluye predecir o diagnosticar la afección, determinar la predisposición a la afección, controlar el tratamiento de la enfermedad, diagnosticar una respuesta terapéutica de la enfermedad y el pronóstico de la afección, progresión de la afección, y la respuesta al tratamiento particular de la afección. Por ejemplo, se puede analizar una muestra de sangre de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para determinar la presencia y/o cantidad de marcadores de una enfermedad o tipo de células malignas en la muestra, diagnosticando o clasificando así una enfermedad o un cáncer.

En algunas realizaciones, los métodos y la composición descritos en la presente memoria se utilizan para el diagnóstico y el pronóstico de una afección.

Numerosas enfermedades y trastornos inmunológicos, proliferativos y malignos son especialmente susceptibles a los métodos descritos en la presente memoria. Las enfermedades y trastornos inmunológicos incluyen enfermedades y trastornos alérgicos, trastornos de la función inmunitaria y enfermedades y afecciones autoinmunes. Las enfermedades y trastornos alérgicos incluyen, pero no se limitan a, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, asma alérgica, eccema atópico, dermatitis atópica y alergia alimentaria. Las inmunodeficiencias incluyen, pero no se limitan a inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndrome hipereosinofílico, enfermedad granulomatosa crónica, deficiencia de adhesión de leucocitos I y II, síndrome de hiper IgE, Chediak Higashi, neutrofilias, neutropenias, aplasias, Agammaglobulinemia, síndromes hiper-IgM, síndromes DiGeorge/velocardiocfaciales y defectos de la vía gamma-TH1 del interferón. Los trastornos de la desregulación autoinmunitaria e inmune incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, oftalmopatía de Graves, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple,

- psoriasis, esclerosis sistémica, bocio y struma linfomatosa (tiroiditis de Hashimoto, bocio linfadenóideo), alopecia aerata, miocarditis autoinmune, liquen escleroso, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, gastritis atrófica, miastenia grave, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de aloinjertos y destrucción de tejido alérgico de reacciones a microorganismos infecciosos o a antígenos ambientales.
- 5 Las enfermedades y trastornos proliferativos que pueden evaluarse mediante los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, hemangiomas en recién nacidos; esclerosis múltiple progresiva secundaria; enfermedad mielodegenerativa progresiva crónica; neurofibromatosis; ganglioneuromatosis; formación queloide; enfermedad de Paget del hueso; enfermedad fibroquística (por ejemplo, de la mama o del útero); sarcoidosis; Peyronie y fibrosis de Dupuytren, cirrosis, aterosclerosis y restenosis vascular.
- 10 Las enfermedades y trastornos malignos que pueden evaluarse mediante los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen tanto neoplasias hematológicas como tumores sólidos.
- Las neoplasias hematológicas son especialmente susceptibles a los métodos descritos en el presente documento cuando la muestra es una muestra de sangre, debido a que tales neoplasias implican cambios en las células sanguíneas. Tales neoplasias incluyen linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfomas de células no B y otros linfomas, leucemias agudas o crónicas, policitemias, trombocitemias, mieloma múltiple, trastornos mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos, mielofibrosis, linfoproliferaciones inmunes atípicas y trastornos de las células plasmáticas.
- 15 Los trastornos de las células de plasma que pueden evaluarse mediante los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen mieloma múltiple, amiloidosis y macroglobulinemia de Waldenström.
- 20 Ejemplo de tumores sólidos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, tumores cerebrales, tumores del sistema nervioso central, tumores de vejiga, melanomas, cáncer de hígado, osteosarcoma y otros cánceres óseos, carcinomas testicular y ovárico, tumores de cabeza y cuello, y neoplasias cervicales.
- 25 Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para diagnosticar infecciones patógenas, por ejemplo, infecciones por bacterias intracelulares y virus, determinando la presencia y/o cantidad de marcadores de bacterias o virus, respectivamente, en la muestra.
- Se puede detectar una amplia variedad de enfermedades infecciosas mediante el procedimiento descrito en la presente memoria. Típicamente, éstos son causados por los agentes infecciosos bacterianos, virales, parasitarios, y por hongos. También se puede determinar la resistencia de varios agentes infecciosos a fármacos.
- 30 Los agentes infecciosos bacterianos que pueden detectarse incluyen *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium aviumintracellulare*, *Yersinia*, *Francisella*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Clostridia*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *estreptococos hemolíticos B*, *Corynebacteria*, *Legionella*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Hemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Treponema palidum*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Rickettsial pathogens*, *Nocardia* y *Actinomycetes*.
- 35 Los agentes infecciosos fúngicos que se pueden detectar incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Phycomycetes (Rhizopus)*, *Sporothrix schenckii*, *Chromomycosis* y *Maduromycosis*.
- 40 Los agentes infecciosos víricos que pueden detectarse incluyen virus de inmunodeficiencia humana, virus linfocitotrófico de células T humanas, virus de hepatitis (por ejemplo, virus de hepatitis B y virus de la hepatitis C), virus Epstein-Barr, citomegalovirus, virus del papiloma humano, *orthomyxo virus*, *paramyxo virus*, adenovirus, virus corona, virus rhabdo, virus de la poliomielitis, virus toga, virus bunya, virus arena, virus de la rubéola y reo virus.
- 45 Los agentes parasitarios que se pueden detectar incluyen *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Onchocerca volvulus*, *Leishmania*, *Trypanosoma spp.*, *Schistosoma spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium*, *Giardia spp.*, *Trichomonas spp.*, *Balantidium coli*, *Wuchereria bancrofti*, *Toxoplasma spp.*, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Dracunculus medinensis*, trematodos, *Diphyllobothrium latum*, *Taenia spp.*, *Pneumocystis carinii* y *Necator americanus*.
- 50 Los métodos descritos en la presente memoria también son útiles para la detección de resistencia a fármacos por agentes infecciosos. Por ejemplo, se pueden identificar *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos y virus de la inmunodeficiencia humana resistente al AZT.
- 55 Por lo tanto, las moléculas diana detectadas usando las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden ser marcadores de pacientes (tales como un marcador de cáncer) o marcadores de infección con un agente foráneo, tales como marcadores bacterianos o víricos.

Debido a la naturaleza cuantitativa de los nanoinformadores, las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para cuantificar la proteína diana cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o condición de enfermedad, por ejemplo, marcadores sanguíneos que son sobrerregulados o subregulados como resultado de un estado de enfermedad.

- 5 En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden usarse para la detección de citoquinas. La baja sensibilidad de los métodos descritos en este documento sería útil para la detección temprana de citoquinas, por ejemplo, como biomarcadores de una afección, diagnóstico o pronóstico de una enfermedad tal como cáncer, y la identificación de afecciones subclínicas.

#### Kits

- 10 La descripción proporciona además kits que comprenden uno o más componentes. Los kits pueden comprender, por ejemplo, uno o más conjuntos de sondas de proteína y/o uno o más nanoinformadores. Los kits pueden usarse para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica, incluyendo los descritos anteriormente.

- 15 En ciertas realizaciones, se proporcionan kits útiles para la extensión e inmovilización selectiva de nanoinformadores. Los kits pueden comprender un sustrato para inmovilización y uno o más compañeros de unión para facilitar la extensión o inmovilización de un nanoinformador. Los compañeros de unión podrían, en ciertas realizaciones, comprender una fracción útil para la extensión del nanoinformador en una fuerza apropiada. En ciertas realizaciones, los compañeros de unión podrían facilitar la inmovilización o inmovilización selectiva del nanoinformador a la superficie. En otras realizaciones, los kits podrían comprender un nanoinformador para extensión e inmovilización. En otras realizaciones, los kits podrían comprender un dispositivo capaz de extender el nanoinformador.

- 20 Los kits pueden contener una población de sondas de proteína y/o nanoinformadores como se describe en la presente memoria.

- 25 Los kits pueden contener nanoinformadores previamente marcados, o nanoinformadores no marcados con uno o más componentes para marcar los nanoinformadores. Además, los nanoinformadores proporcionados en un kit pueden tener o no secuencias específicas para el objetivo previamente unidas. En una realización, las secuencias diana se proporcionan en el kit no unido a la cadena principal del nanoinformador.

Los kits pueden comprender otros reactivos tales como oligos señal, oligos enlazadores y oligos puente. En algunas realizaciones, los kits pueden separar los pares de sondas de proteína en diferentes mezclas.

Los kits pueden incluir también otros reactivos, por ejemplo, reguladores para realizar reacciones de hibridación, enlazadores, endonucleasas de restricción y ADN I ligasas.

- 30 Los kits también incluirán instrucciones para usar los componentes del kit, y/o para fabricar y/o usar los nanoinformadores marcados.

#### Ejemplos

Ejemplo 1. Detección de proteínas usando mediciones indirectas - Ensayo tipo sándwich en solución

- 35 Un diagrama del protocolo para este ejemplo se representa en la Figura 1. En este ejemplo se establece el ensayo para separar la unión del objetivo de proteína de la hibridación de los informadores para eliminar problemas con la falta de correspondencia entre la baja afinidad de unión de las sondas de proteína y la concentración de trabajo de los informadores.

Marcador del anticuerpo de detección con oligo y purificación

- 40 Los oligo enlazadores se unieron al anticuerpo mediante unión aleatoria de amina usando una relación de 10 a 1 de oligos enlazadores a anticuerpos. En resumen, se acopló el entrelazador bifuncional 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (SMPB) (ThermoFisher, Inc., Waltham, MA) al anticuerpo anti-IL2 A, después se hizo reaccionar con un oligo tiolado para entrelazador en una relación anticuerpo:oligo de 1:3 a temperatura ambiente. El anticuerpo A enlazado a SMPB se purificó haciendo pasar la mezcla a través de la columna Zeba 2X, 1000G, (ThermoFisher, Inc., Waltham, MA) y se determinó el rendimiento.

- 45 Para acoplar oligo al anticuerpo A de IL-2 enlazado a SMPB, se añadió el oligo al anticuerpo purificado enlazado a SMPB a 4°C.

El oligo enlazado al anticuerpo A de IL-2, se añadieron el anticuerpo-SMPB-oligo y PBE al Dispositivo Centrífugo Pall Nanosep® con Membrana Omega, (MWCO 100 kDa, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO), se lavó y se centrifugó.

Hibridación del oligo señal con el anticuerpo de detección

- 50 El oligo señal se hibridó previamente con el oligo enlazado al anticuerpo A de IL-2 mediante la adición del anticuerpo IL2 enlazado al oligo y oligo señal en una relación de 3:2, relación oligo señal:anticuerpo. Se contemplan otras relaciones.

Formación del complejo objetivo y anticuerpos

5 El anticuerpo A de IL-2 hibridado con oligo señal se mezcló con anticuerpo B biotinilado (BAF202, R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN) a aproximadamente  $1 \times 10^{-15}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M, y bloqueadores (esperma de salmón), con espacio para agregar solución objetivo. La proteína diana IL-2 se añadió a la dilución deseada  $< 1 \times 10^{-8}$  M). Los anticuerpos estaban a una concentración 10X sobre un Kd estimado de  $10^{0-15}$  a  $10^{0-8}$  M. Se incubó la mezcla.

El complejo de proteína diana y anticuerpos se purificó usando Dynabeads® acoplado a estreptavidina (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo.

Elución del oligo señal

10 Se lavó el complejo de proteína/anticuerpo diana aislado y se eluyó el oligo señal a más de 45°C usando SSPE 0,1X durante 10 a 15 minutos. Los periodos más cortos y más largos se contemplan bajo el subtítulo Detección del oligo señal.

15 La detección del oligo señal en cada muestra se llevó a cabo usando un sistema nanoinformador dual que tiene tanto sondas de nanoinformador marcadas como sondas de nanoinformador no marcadas. Se hibridaron los oligos señal de cada muestra con las concentraciones finales de los reactivos de hibridación como sigue: sonda informadora marcada con sonda biotinilada no marcada, SSPE 5X (pH 7,5), reactivo de Denhardt 5X (Sigma), ADN de esperma de salmón cortado (Sigma) y detergente. Los reactivos se mezclaron y se incubaron en un bloque termociclador con una tapa calentada durante 16 horas.

Purificación posterior a la hibridación

20 Para eliminar los informadores no hibridados, las reacciones se purificaron sobre perlas magnéticas (Invitrogen<sup>MR</sup>) acopladas a oligonucleótidos complementarios a la secuencia de repetición 3' contenida en cada sonda biotinilada. Las reacciones se diluyeron primero con SSPE en una mezcla de detergente al 0,1%/TE y se permitió que se unieran a perlas a una temperatura mayor de 20°C con rotación continua. Las perlas se lavaron tres veces en SSPE y detergente y se hibridaron los complejos eluidos en SSPE 0,1X/0,1%/mezcla de detergente durante 15 minutos a 45°C. Después de la elución, las muestras se purificaron una segunda vez para retirar el exceso de sondas biotiniladas mediante unión a perlas magnéticas acopladas a oligonucleótidos complementarios a la secuencia de repetición 5' contenida en cada sonda informadora. Las eluciones de las perlas de repetición anti-3' se llevaron hasta una concentración final de SSPE 1X y se unieron durante 15 minutos a 22,5°C con rotación. Las perlas se lavaron como anteriormente y se eluyeron en SSPE 0,1X /0,1%/mezcla de detergente a más de 40°C. Se prepararon luego las muestras doblemente purificadas para la captura como se describe a continuación.

30 Captura, estiramiento y formación de imágenes del informador NanoString

Se añadió una solución de una formulación personalizada de microesferas fluorescentes Tetraspek (Invitrogen<sup>MR</sup>) a cada muestra. Las muestras se cargaron en un dispositivo fluido NanoString procesado y se tomaron imágenes.

Resultados:

35 Los resultados se muestran en la Figura 2. Los resultados de este experimento mostraron que la IL-2 se detectó mediante el ensayo descrito aquí (Figura 2). Este experimento mostró una sensibilidad de aproximadamente  $110^{-11}$  a  $110^{-10}$  M. La eficacia de la detección es la pendiente mostrada en la gráfica de la Figura 3. La eficacia observada se debió probablemente a la afinidad de unión del anticuerpo al que se había unido el oligo señal. Este anticuerpo parece tener un Kd de aproximadamente  $1,3 \times 10^{-7}$ . Se espera que la eficacia se pueda incrementar 100X reemplazando este anticuerpo con un anticuerpo que tiene un Kd de aproximadamente  $10^{-9}$ .

40 Se espera que, con mejoras en la eficiencia y modestas mejoras en el fondo, la sensibilidad debe alcanzar niveles de  $1 \times 10^{-13}$  M, pero se pueden conseguir mejoras adicionales con la reducción continua del fondo.

Esta tecnología permite la multiplexación a niveles más allá de lo posible actualmente, tiene el potencial de permitir una cuantificación más precisa y, posiblemente, una mayor sensibilidad, aunque sólo un desarrollo posterior demostrará ser el último punto.

45 Ejemplo 2. Detección de proteínas usando medición directa - Solución tripartita - Sonda de proteína unida al informador

Un diagrama del protocolo para este ejemplo se representa en la Figura 4. En este ejemplo, el nanoinformador está unido a uno de los anticuerpos. La preparación de los anticuerpos y la unión a la muestra sucede de forma similar al protocolo descrito en el Ejemplo 1. En el ensayo descrito en la Figura 4 se forma un complejo de proteína diana y anticuerpos en el que uno de los anticuerpos está unido a biotina y el otro anticuerpo tiene un nanoinformador adjunto.

50 Este enfoque funcionaría mejor con anticuerpos de Kd de medio a bajo, es decir, una fuerte afinidad de unión. Sin pretender limitarse a ninguna teoría, la Kd (constante de disociación) de un anticuerpo es generalmente mucho mayor que las concentraciones de trabajo de los nanoinformadores. Para trabajar con anticuerpos unidos a nanoinformadores, la Kd necesita ser diez veces más baja que la concentración de trabajo de los informadores para asegurar una unión >

90% del objetivo a la sonda. La Figura 5 muestra un cálculo del Kd ideal para las sondas necesarias en este ensayo. La Figura 5 muestra la fracción del objetivo unido frente a la Kd de la sonda de nanoinformador y la sonda de proteína. La Figura 5 muestra que la Kd ideal para las sondas de proteína sería aproximadamente  $1,0 \times 10^{-15}$  a  $1,0 \times 10^{-10}$ . Esta Kd permitiría concentraciones de informadores multiplexados por debajo del umbral de enmarañamiento de informador de  $1 \times 10^{-7}$  M.

#### Unión del nanoinformador al anticuerpo

Una aproximación es unir el anticuerpo al informador antes de la unión del anticuerpo a la proteína diana. Este enfoque requiere unos anticuerpos de afinidad de unión (Kd) muy fuerte para permitir concentraciones de informadores multiplexados significativamente por debajo del umbral de enmarañamiento del informador de  $1 \times 10^{-7}$  M.

Se añade un oligo enlazador al anticuerpo como se describe en el Ejemplo 1. El nanoinformador está unido al anticuerpo por hibridación con el oligo enlazador a temperaturas entre 37 y 45°C. La proporción anticuerpo:informador era de 1:1. El anticuerpo marcado y el informador se hibridaron a 0,05 nM, 37°C, SSPE 1X, durante la noche.

Un segundo enfoque directo consiste en unir primero los anticuerpos al objetivo en solución y purificar el complejo como se describe en el Ejemplo 1. Después de la purificación, el nanoinformador se hibrida con el anticuerpo (después de la unión del objetivo) usando el protocolo descrito anteriormente. En este enfoque, se evitan problemas de falta de correlación entre hibridación y unión a proteínas.

Para ambos enfoques, también se necesitan fuertes afinidades de unión para permanecer unidas durante las purificaciones y durante la formación de imágenes. Básicamente, la tasa Kde pérdida (disociación de anticuerpos de la proteína diana) debe ser mayor que el tiempo de purificación y lectura del ensayo.

La purificación del complejo de proteína diana-anticuerpos se puede realizar como se describe en el Ejemplo 1. La elución se puede lograr mediante la fusión de perlas G y F o mediante digestión. Sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que la fusión del complejo podría requerir la optimización de las condiciones para permitir que los anticuerpos permanezcan unidos pero los marcadores de afinidad se liberen.

El complejo de proteína-anticuerpo puede unirse a un cubreobjetos recubierto con estreptavidina (Optichem®, Accelr8 Technology Corporation), estirado e imagen como se describe en el Ejemplo 1. Se ensayó el estiramiento de un informador hibridado con un anticuerpo para asegurarse de que la presencia del anticuerpo no provoque unión o adherencia no específica a la superficie que inhibe el proceso normal de unión, estiramiento y formación de imágenes (datos no mostrados).

#### Ejemplo 3. Detección de proteínas usando medición indirecta - Ensayo tipo sándwich sobre una superficie

Un diagrama del protocolo para este Ejemplo se representa en la Figura 6. En este Ejemplo el anticuerpo de captura está unido a una superficie, por ejemplo, una perla magnética, y el segundo anticuerpo está unido a un oligo señal. Los anticuerpos se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica incluyendo los métodos descritos en el Ejemplo 1. En este ejemplo, las proteínas y los nanoinformadores están en gran parte separados, lo que elimina las preocupaciones sobre la adherencia de las proteínas. En este ensayo, las concentraciones de anticuerpos locales en la superficie pueden ser altas.

Las proteínas diana se mezclan con el anticuerpo de captura en las perlas magnéticas (2 horas hasta una noche, PBS 1X, y temperatura ambiente). La muestra de proteína no unida se elimina por lavado. El complejo de oligo señal anticuerpo marcado se añade a las perlas con bloqueadores (PBS 1X y temperatura ambiente). Después de un período de unión, el exceso de complejo de oligo señal anticuerpo marcado se elimina por lavado. El complejo de proteína/anticuerpo diana aislado se lava entonces y el oligo señal se eluye y se analiza como se describe en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo 6. Detección de proteínas usando medición indirecta - Oligos señal biotinilados

Un diagrama del protocolo para este Ejemplo se representa en la Figura 7. En este Ejemplo el anticuerpo de captura se une a una superficie, por ejemplo, una perla magnética, y el segundo anticuerpo está en solución o unido a un oligo señal biotinilado. Este ensayo proporciona las ventajas de que sólo requiere dos purificaciones de perlas. Además, en este ensayo, como en el Ejemplo 2, las proteínas y los nanoinformadores están en gran parte separados, lo que elimina las preocupaciones sobre la adherencia de las proteínas. Las proteínas diana se mezclan con el anticuerpo de captura, el complejo de oligo señal anticuerpo marcado y los bloqueadores como se describe en el Ejemplo 3. El complejo de proteína diana y anticuerpos se purifica usando la perla magnética en el anticuerpo de captura como se describe en el Ejemplo 3.

El complejo de proteína diana/anticuerpo aislado se lava entonces y el oligo señal se eluye como se describe en el Ejemplo 1. El oligo señal puede entonces purificarse usando Dynabeads® acoplado a estreptavidina (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El oligo señal se analiza entonces como se describe en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo 7. Detección de proteínas usando ligación de proximidad - Medición indirecta

En la Figura 8 se representa un diagrama del protocolo para este Ejemplo. En este ensayo se ligan dos oligos físicamente cercanos. Las sondas que contienen los oligos están diseñadas para unirse por parejas a las proteínas diana y formar un oligo señal por ligación cuando las sondas se aproximan.

5 Este enfoque tiene varios beneficios en cuanto a sensibilidad, minimización de la reactividad cruzada y multiplexación. Las ligaciones de proximidad han mostrado una alta sensibilidad y tienen el efecto de reducir la Kd aparente disminuyendo esencialmente la tasa de desconexión.

10 Las sondas que contienen los oligos se preparan y purifican como se describe en Gullberg et al., PNAS 101 (22), páginas 8420-24 (2004). Las proteínas diana se mezclan entonces con las sondas que contienen los oligos y los oligos puente incubando las muestras durante una hora. Los componentes requeridos para la ligación de la sonda se añaden entonces como se describe en Gullberg et al. Después de cinco minutos de ligación a temperatura ambiente, el oligo señal se libera a través de la reducción de disulfuro, escisión de uracilo, digestión de restricción, proteinasa K, o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Además, el oligo señal puede liberarse por los métodos representados en la Figura 8B-8D

El oligo señal se analiza como se describe en el Ejemplo 1.

15 Alternativamente, el ensayo puede realizarse como se representa en la Figura 9. En este enfoque, uno de los oligos se une a un nanoinformador.

20 Este enfoque aprovecha la disminución del Kde pérdida mediante ligación de proximidad. Un Kde pérdida más bajo significa un Kd más bajo y la capacidad de trabajar con concentraciones más bajas de sonda de proteína. Esta disminución en Kd hace que sea más fácil trabajar en concentraciones requeridas para los informadores y, por lo tanto, contemplar enfoques de detección directa para el análisis multiplex y menores costos de reactivos. Este enfoque no necesita de una etapa para la hibridación con los informadores dentro del ensayo como algunos de los otros métodos propuestos aquí. Por lo tanto, será más rápido y tendrá un tiempo más corto para responder.

25 Utilizando el enfoque descrito en la Figura 8C, las condiciones de purificación se optimizan para eliminar los oligos ligados de los oligos no ligados después de la liberación de los anticuerpos. Por ejemplo, esta etapa de purificación puede realizarse usando perlas magnéticas. Es importante destacar que, si la cantidad de anticuerpo usada es mayor que la cantidad de informadores usados, entonces el exceso resultante de oligos no ligados puede bloquear la hibridación del informador con el oligo.

30 Los pares de anticuerpos se marcaron con oligos usando los métodos descritos en el Ejemplo 8. Estos oligos se diseñaron para incluir un oligo puente que tenía una superposición de 9 bases y temperaturas de fusión de 37°C en PBS 1X. El oligo puente tenía 18 bases y un marcador de biotina con fines de purificación. Los oligos ligados tienen 18 bases de solapamiento con el puente biotinilado y, por lo tanto, los oligos ligados son más estables que los oligos no ligados que están unidos a los anticuerpos. Los oligos biotinilados se aíslan de la solución sobre perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Se determinó que sólo los oligos ligados tienen temperaturas de fusión suficientemente altas para permanecer unidos a los oligos biotinilados después de una etapa de enjuague usando condiciones de amortiguación rigurosas.

40 La Figura 13 demuestra cómo se purifican diversos componentes en una variedad de condiciones de regulador. Los componentes estaban presentes en solución a las concentraciones utilizadas en el ensayo. Las soluciones fueron digeridas por proteasa antes de la purificación para liberar los oligos de los anticuerpos, como se realiza en el ensayo. Como se esperaba por las estimaciones de temperatura de fusión, el SSPE 0,03X proporcionó el regulador más eficiente. PROX05 representa un producto ligado que se retiene después de esta etapa de enjuague.

Ejemplo 8. Detección de proteínas usando mediciones indirectas - Ensayo multiplexado en solución

Este ejemplo es similar al Ejemplo 1, sin embargo, la detección es multiplexada y utiliza una química de acoplamiento diferente entre los anticuerpos y los oligos.

Bioinformática

45 Se diseñaron oligos señal con una reactividad cruzada mínima a un intervalo de temperaturas, típicamente desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 37°C, y PBS 1X. Solapamientos únicos entre oligos señal y oligos de marcación tenían temperaturas de fusión de 51 a 56 en PBS 1X para permitir la hibridación del oligo señal con el oligo de marcación a 37°C. Estos solapamientos de 15 a 17 bases tenían temperaturas de fusión de 41 a 45°C en SSPE 0,1X para permitir la elución después de una purificación de perlas magnéticas.

50 Acoplamiento de oligo a anticuerpos

Los oligonucleótidos se acoplaron a anticuerpos usando química de aldehído-hidracina. Todos los anticuerpos y el objetivo se adquirieron de R & D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Cada anticuerpo A (ver Tabla 1) se desaló usando una columna de centrifugación de exclusión por tamaño (0,5 ml Zeba Spin Column, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Se

hizo reaccionar 6-hidrazinonicotinato de succinimidilacetona hidrazona (Solulink, San Diego, CA) con cada anticuerpo A. Cada anticuerpo se purificó de nuevo usando una columna de centrifugación de exclusión por tamaño.

Tabla 1. Anticuerpos

Número de las partes

Proteína	Objetivo	Anticuerpo A	Anticuerpo B
TNF alfa	210-TA-010	MAB610	BAF210
IL1 alfa	200-LA-002	MAB200	BAF200
IL6 alfa	206-TA-010	MAB206	BAF206
VEGF	293-VE-010	MAB293	BAF293

5 Los oligos de amina se desalaron usando una columna de centrifugación de membrana (5K MWCO VivaSpin, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Se hicieron reaccionar 20 equivalentes molares de benzoato de succinimidil-4-formilo (Solulink, San Diego, CA) con cada oligo. Los oligos se purificaron de nuevo usando columnas de centrifugación de membrana.

10 Cada oligo modificado correspondiente se hizo reaccionar con el correspondiente anticuerpo modificado en una proporción molar de 3 a 1. Este se purificó en una columna de centrifugación (columna Zeba Spin de 2 ml, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). La Tabla 2 muestra que entre 1-2 oligos se unieron a cada anticuerpo al final del proceso de recuento (Oligo:Ab).

Tabla 2. Relaciones de sustitución molar que muestran el control de calidad y las capacidades de cuantificación del proceso de acoplamiento anticuerpo - oligo

Anticuerpo	MSR (relación de sustitución molar)		
	4FB:oligo	HyNic:Ab	Oligo:Ab
TNF-alfa	1,46	7,3	1,48
IL1alfa	2,31	11	1,53
VEGF	3,58	7,0	2,07
IL6	1,34	7,4	1,37

15

Hibridación del oligo señal con el anticuerpo de detección

Cada oligo señal único se hibrida previamente por separado con el oligo único unido a cada anticuerpo A mediante la adición de un anticuerpo A enlazado al oligo y el oligo señal correspondiente en una relación de 4:1, relación de oligo señal:anticuerpo. Se contemplan otras relaciones.

20 Formación del complejo objetivo y anticuerpos

Se creó una mezcla maestra 2X que contenía: cada anticuerpo A hibridado con oligo señal y anticuerpo B biotinilado (4 pares) en un solo tubo a aproximadamente  $1 \times 10^{-15}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M, con bloqueadores (espermatozoides de salmón). Las proteínas diana se añadieron a la dilución deseada ( $< 1 \times 10^{-8}$  M) a alícuotas de esta mezcla maestra. Los anticuerpos estaban a una concentración 10X sobre un Kd estimado de  $10^{-15}$  a  $10^{-8}$  M. La mezcla se incubó.

25 El complejo de proteína diana y anticuerpos se purificó usando Dynabeads® acoplado con estreptavidina (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo.

Elución de oligo señal

Se lavó el complejo de proteína diana/anticuerpo aislado y se eluyó el oligo señal a más de 45°C usando SSPE 0,1X durante 10 a 15 minutos. Se contemplan períodos más cortos y más largos

30 Detección del oligo señal:



La detección del oligo señal en cada muestra se llevó a cabo utilizando un sistema nanoinformador dual que tenía tanto sondas de nanoinformador marcadas como sondas de nanoinformador no marcadas. Se hibridaron los oligos señal de cada muestra con las concentraciones finales de los reactivos de hibridación como sigue: sonda informadora marcada con sonda biotinilada no marcada, SSPE 5X (pH 7,5), reactivo de Denhardt 5X (Sigma), ADN de esperma de salmón cortado (Sigma) y detergente. Los reactivos se mezclaron y se incubaron en un bloque termociclador con una tapa calentada durante 16 horas.

#### Purificación posterior a la hibridación

Para eliminar informadores no hibridados, se purificaron las reacciones sobre perlas magnéticas (Invitrogen<sup>MR</sup>) acopladas a oligonucleótidos complementarios a la secuencia de repetición 3' contenida en cada sonda biotinilada. Las reacciones se diluyeron primero con SSPE en una mezcla de detergente al 0,1%/TE y se permitió que se unieran a perlas a más de 20°C con rotación continua. Las perlas se lavaron tres veces en SSPE y detergente y se eluyeron los complejos hibridados en SSPE 0,1X/0,1%/mezcla de detergente durante 15 minutos a 45°C. Después de la elución, las muestras se purificaron una segunda vez para retirar el exceso de sondas biotiniladas mediante unión a perlas magnéticas acopladas a oligonucleótidos complementarios a la secuencia de repetición 5' contenida en cada sonda informadora. Las eluciones de las perlas de repetición anti-3' se llevaron a una concentración final de SSPE 1X y se unieron durante 15 minutos a 22,5°C con rotación. Las perlas se lavaron como anteriormente y se eluyeron en SSPE 0,1 x /0,1%/mezcla de detergente a más de 40°C. Las muestras doblemente purificadas se prepararon entonces para la captura como se describe a continuación.

#### Captura, estiramiento y formación de imágenes del informador NanoString

Se añadió a cada muestra una solución de una formulación personalizada de microesferas fluorescentes Tetraspeck (Invitrogen<sup>MR</sup>). Las muestras se cargaron en un dispositivo fluido NanoString procesado y se formaron imágenes.

#### Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 10. Los resultados de este experimento mostraron que se detectaron simultáneamente 4 proteínas mediante el ensayo descrito aquí (Figura 10). Las proteínas detectadas fueron TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , IL6 y VEGF. Este experimento mostró sensibilidades de aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M. La Figura 11 muestra los mismos datos representados frente a la muestra de fluido. Un experimento posterior (Figura 12) mostró que el límite de detección de dos de estas proteínas era de 26 y 38 pg/ml ( $1,4 \times 10^{-12}$  y  $1,9 \times 10^{-12}$  M para IL1 $\alpha$  e IL6, respectivamente).

Las mejoras en el fondo, es decir, la reducción de la detección de fondo o la mejora de las relaciones de detección de fondo con respecto al blanco, permiten aumentos de sensibilidades de aproximadamente 2 órdenes de magnitud, por lo que la sensibilidad alcanzaría  $1 \times 10^{-14}$  M o significativamente  $< 1$  pg/ml.

#### Ejemplo 9. Informador de sonda anti-estreptavidina

Se marcó un anticuerpo anti-estreptavidina (Affinity Bioreagents, Rockford, IL) con un oligonucleótido (oligo), como se describe en el Ejemplo 1.

En un ejemplo particular de esta realización, se hibridó un oligo marcado con anticuerpo con un informador a una concentración de 0,05 nM, a una temperatura de 45°C, en regulador de SSPE 1x, durante la noche. Había una superposición de 25 bases entre el informador y el oligo que estaba unido al anticuerpo. Esta superposición puede acortarse, si se desea. En ciertas realizaciones, la superposición es opcionalmente 1, 5, 10, 15, 20, 25 bases o cualquier longitud entre ellas. Una superposición más corta de las bases entre el indicador y el oligo en el anticuerpo permite una mayor eficiencia de hibridación del anticuerpo-oligo con el informador a temperaturas que producen estabilidad del anticuerpo. Se introdujo un informador con una sonda de anticuerpo anti-estreptavidina en la cámara de flujo del cartucho (a una concentración de 0,025 nM en regulador SSPE 0,25X) y se dejó que un primer extremo del indicador se uniera a la superficie de estreptavidina durante 10 minutos. Después, la cámara se lavó con regulador TAE. Los informadores se estiraron y posteriormente se inmovilizaron en la superficie utilizando primero un campo eléctrico de 200 voltios (V)/centímetro (cm) y, segundo, introduciendo oligos biotinilados para unir un segundo extremo del informador a la superficie. La muestra se lavó de nuevo con TAE, y se introdujo SlowFade<sup>MR</sup> para estabilizar los colorantes. A continuación, se tomó una imagen de esta muestra.

La Figura 14 muestra que sólo se detectó el informador con la sonda anti-estreptavidina (S16).

Reivindicaciones

1. Un método para determinar la concentración de al menos una proteína en una muestra que comprende las etapas:
  - (a) proporcionar:
    - (i) al menos una proteína;
    - 5 (ii) una primera sonda de proteína específica para una primera región de dicha al menos una proteína, en donde dicha primera sonda de proteína está unida a una primera región de captura o a una primera matriz;
    - (iii) una segunda sonda de proteína específica para una segunda región de dicha al menos una proteína, en donde dicha segunda sonda de proteína comprende un oligo señal; y
    - 10 (iv) cuando dicha primera sonda está unida a una primera región de captura: una segunda matriz que tiene unida a ella una fracción que es capaz de unirse a dicha región de captura en dicha primera sonda de proteína;
  - (b) formar al menos un primer complejo que comprende dicha al menos una proteína, dicha primera sonda de proteína y dicha segunda sonda de proteína, en donde dicha al menos una proteína está unida a dichas primera y segunda sondas de proteína, y en donde cuando dicha primera sonda está unida a una primera región de captura, dicha sonda de captura está unida a dicha fracción en dicha segunda matriz;
  - 15 (c) liberar dicho oligo señal de dicho primer complejo;
  - (d) formar un segundo complejo que comprende (1) al menos dicho oligo señal y (2) al menos una sonda de oligo que comprende una región específica del oligo señal y una región que comprende un nanoinformador en donde dicho nanoinformador comprende una pluralidad de diferentes marcadores detectables;
  - 20 (e) detectar individualmente dicho segundo complejo o al menos parte de dicho segundo complejo por un método que comprende contar individualmente la presencia de la pluralidad de diferentes marcadores detectables de dicho nanoinformador, en donde el recuento de la pluralidad de diferentes marcadores detectables es indicativo de la concentración de dicha proteína en dicha muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho oligo señal está unido a una segunda región de captura, preferiblemente en el que dicha liberación de dicho oligo señal comprende además capturar directa o indirectamente dicha molécula de señal en una tercera matriz,
  - 25 preferiblemente en donde dicho nanoinformador comprende además una región constante que comprende una pluralidad de secuencias de repetición de nucleótidos, y preferiblemente en donde dicha región constante está unida a una segunda fracción en dicha tercera matriz, en donde dicha segunda fracción es capaz de unirse a dicha región constante.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la matriz, o la primera o segunda matriz, respectivamente, se selecciona del grupo que consiste en una perla y una matriz.
4. Método de la reivindicación 1, que comprende además determinar la concentración de una pluralidad de proteínas diana por un método que comprende formar una pluralidad de complejos, comprendiendo cada complejo (i) al menos una proteína diana (ii) una primera sonda de proteína específica para una primera región de dicha al menos una proteína, en donde dicha primera sonda de proteína está unida a una región de captura o una primera matriz (iii) una segunda sonda de proteína específica para una segunda región de dicha al menos una proteína, en donde dicha segunda sonda de proteína comprende un oligo señal, en donde cuando dicha primera sonda está unida a una primera región de captura, dicha sonda de captura está unida a dicha fracción en dicha segunda matriz, y en donde cada segunda sonda de proteína en cada una de dicha pluralidad de complejos que comprende un oligo señal diferente,
  - 35 preferiblemente en donde la primera matriz es una perla y la perla comprende una pluralidad de primeras sondas de proteína idénticas.
5. El método de la reivindicación 4, en el que se determina la concentración de hasta 2.000, o hasta 980, diferentes proteínas diana.
6. Un método para determinar la concentración de al menos una proteína en una muestra que comprende las etapas:
  - 45 (a) proporcionar:
    - (i) al menos una proteína;
    - (ii) una primera sonda de proteína específica para una primera región de dicha al menos una proteína, en donde dicha primera sonda de proteína está unida a un primer oligo;

- (iii) una segunda sonda de proteína específica para una segunda región de dicha al menos una proteína, en donde dicha segunda sonda de proteína está unida a un segundo oligo;
- 5 (b) formar un primer complejo que comprende dicha al menos una proteína, dicha primera sonda de proteína y dicha segunda sonda de proteína, en donde dicha al menos una proteína está unida a dichas sondas de proteína primera y segunda,
- (c) ligar dicho primer oligo y dicho segundo oligo para formar un oligo señal
- (d) formar un segundo complejo que comprende (1) al menos dicho oligo señal y (2) al menos una sonda oligo que comprende una región específica de oligo señal y una región que comprende un nanoinformador en donde dicho nanoinformador comprende una pluralidad de diferentes de marcadores detectables
- 10 (e) detectar individualmente dicho segundo complejo o al menos parte de dicho segundo complejo por un método que comprende contar individualmente la presencia de la pluralidad de diferentes etiquetas detectables de dicho nanoinformador, en donde el recuento de la pluralidad de diferentes marcadores detectables es indicativo de la concentración de dicha proteína en dicha muestra.
- 15 7. El método de la reivindicación 6 que comprende además liberar dicho oligo señal de dicho primer complejo, preferiblemente en donde dicho oligo señal comprende una región de captura,
- preferiblemente en donde dicha liberación de dicho oligo señal comprende además capturar directa o indirectamente dicha molécula señal en una matriz.
8. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 6, en el que dicha detección individual comprende además la detección de una señal digital.
- 20 9. El método según la reivindicación 6, que comprende determinar además la concentración de una pluralidad de proteínas diana por un método que comprende formar una pluralidad de complejos, comprendiendo cada complejo (i) al menos una proteína diana (ii) una primera sonda de proteína específica para una primera región de dicha al menos una proteína, en donde dicha primera sonda de proteína está unida a un primer oligo (iii) una segunda sonda de proteína específica para una segunda región de dicha al menos una proteína, en donde dicha segunda sonda de proteína está unida a un segundo oligo, en donde la ligación de dicho primer oligo y dicho segundo oligo forman un oligo señal, y en donde cada complejo en dicha pluralidad de complejos comprende un oligo señal diferente.
- 25 10. El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 9, en el que se determina la concentración de dos o más proteínas diana, preferiblemente en la que la concentración de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000 o más de 1.000 proteínas diana diferentes,
- 30 preferiblemente, de acuerdo con la reivindicación 8 cuando depende de la reivindicación 6, se determina la concentración de al menos 972 proteínas diana diferentes.
11. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 6, en el que dicha primera sonda de proteína y dicha segunda sonda de proteína se seleccionan independientemente, o la región específica del objetivo se selecciona, respectivamente, del grupo que consiste en anticuerpo, péptido, aptámero y peptoide.
- 35 12. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 6, en el que dicho nanoinformador comprende una cadena principal de ácido nucleico de cadena sencilla, comprendiendo dicha estructura una pluralidad de regiones de unión del marcador unidas covalentemente entre sí en una combinación lineal, en la que cada región de unión del marcador se hibrida con una secuencia de polinucleótidos complementaria que tiene unida al marcador detectable.

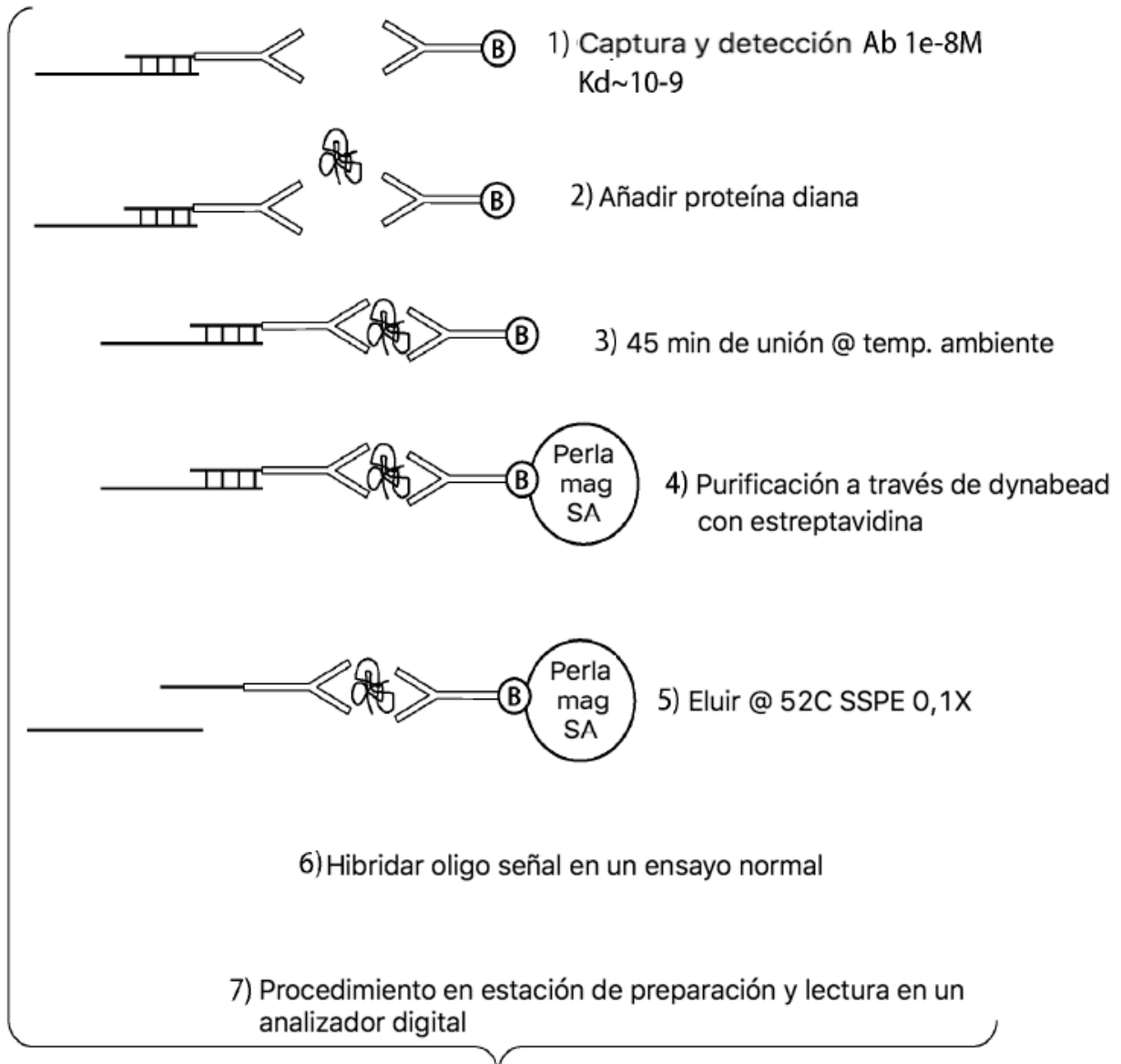


Fig. 1

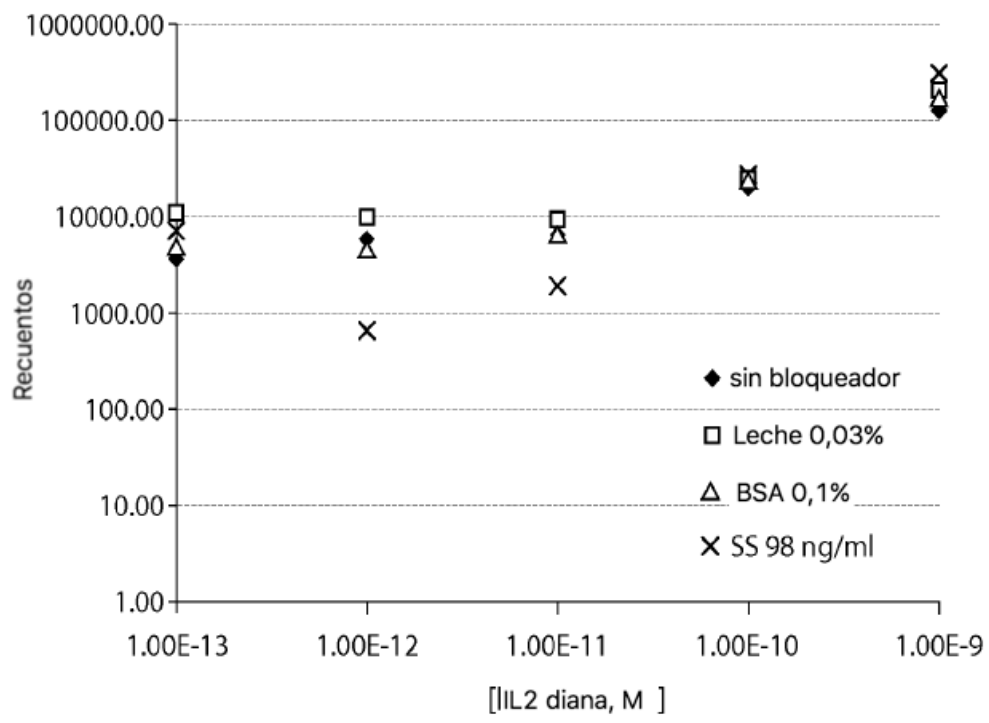


Fig. 2

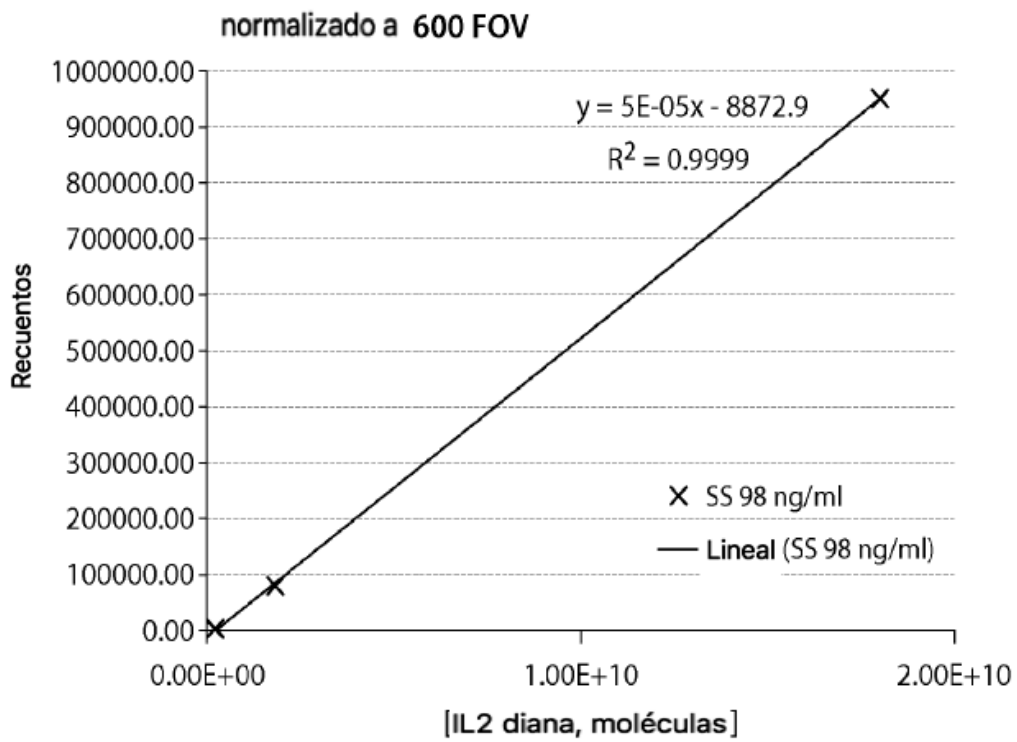


Fig. 3

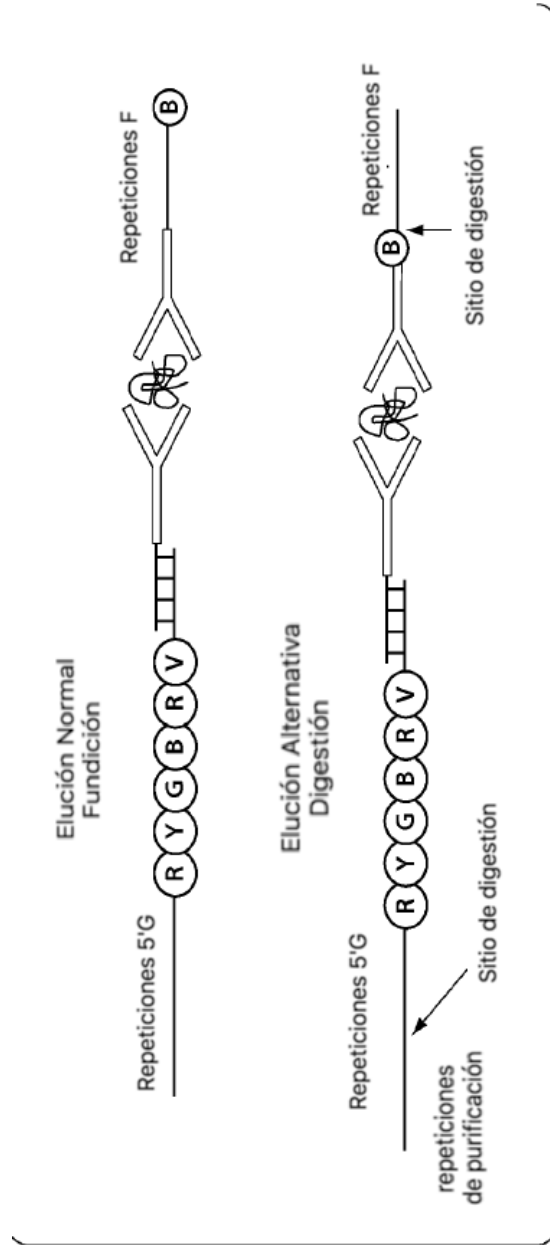


Fig. 4

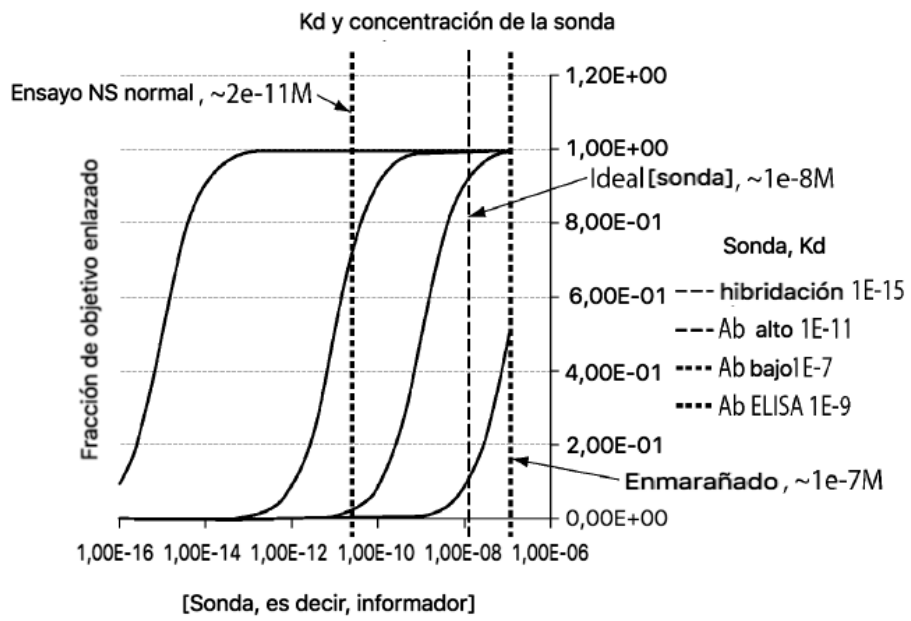


Fig. 5



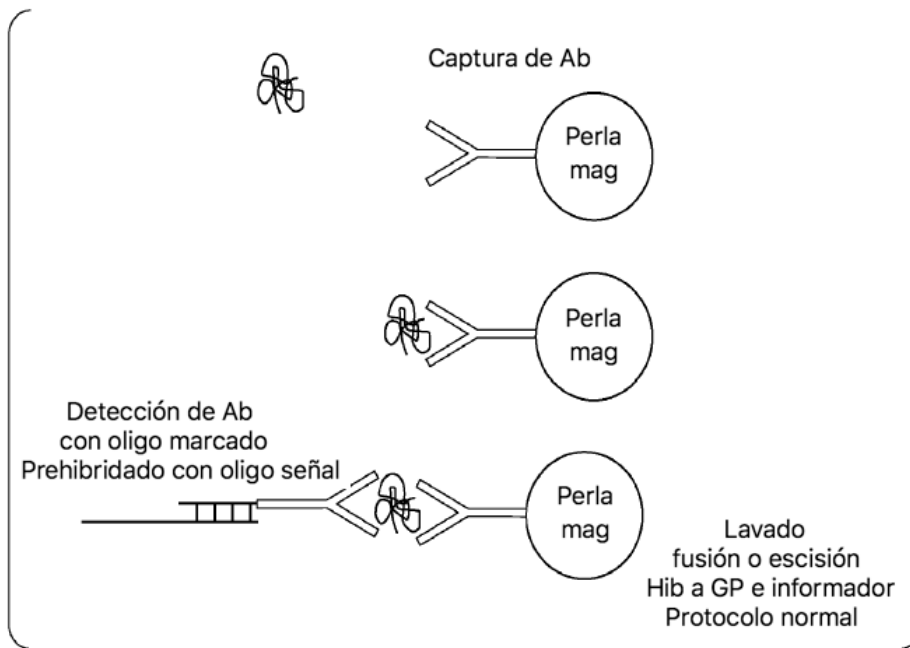


Fig. 6

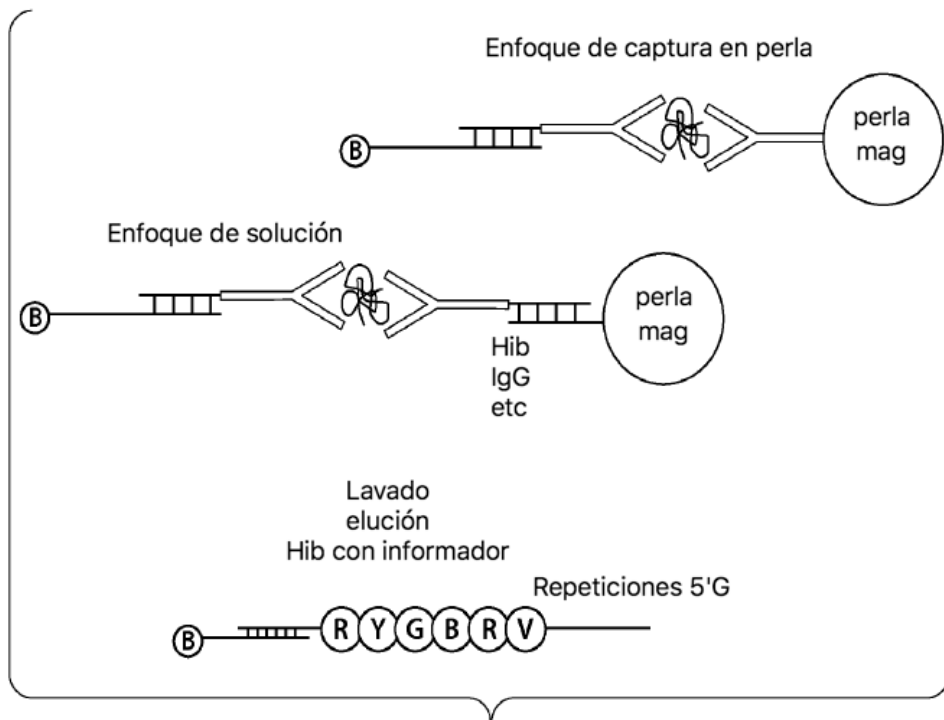


Fig. 7A

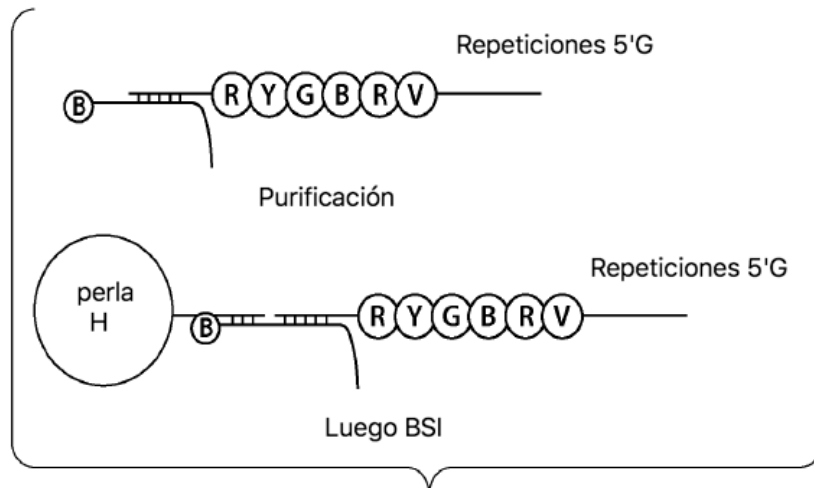


Fig. 7B

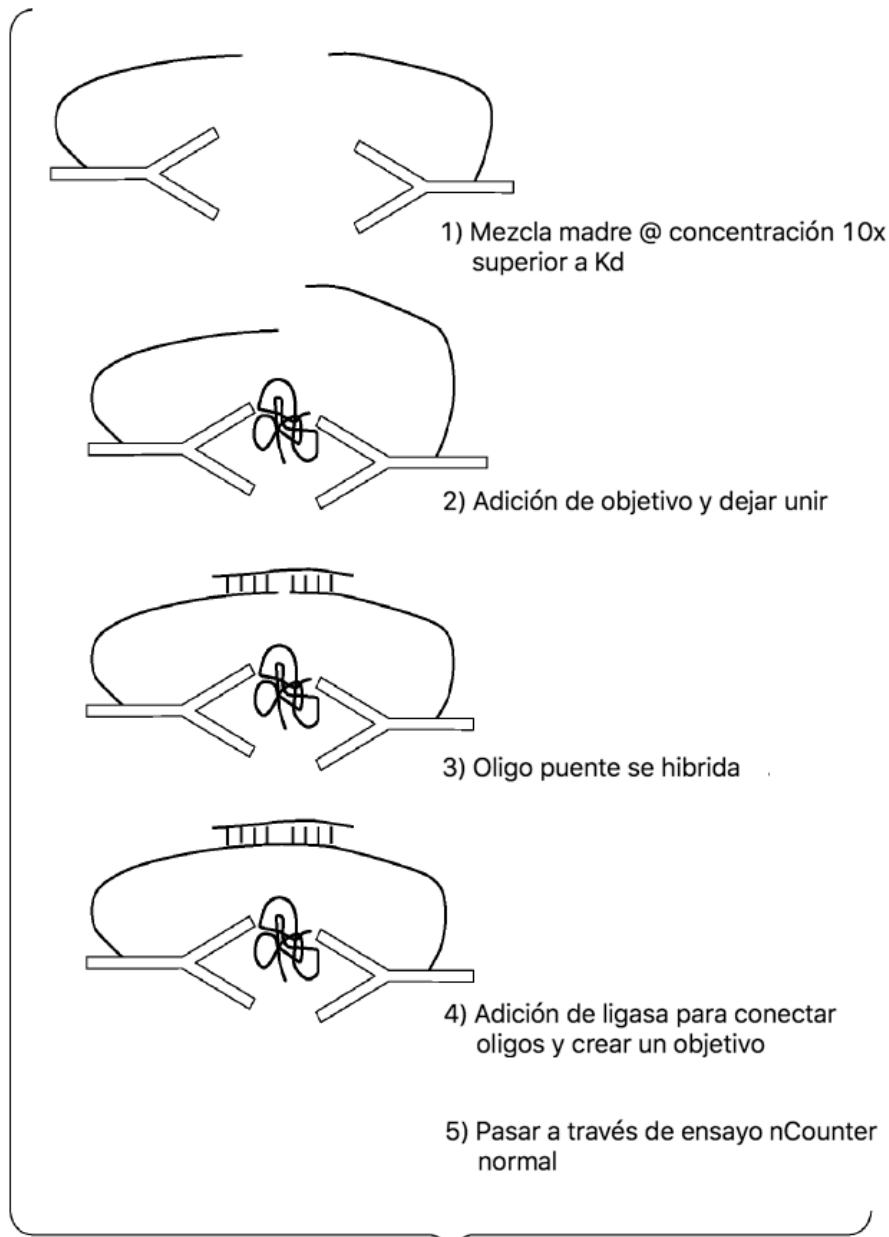


Fig. 8A

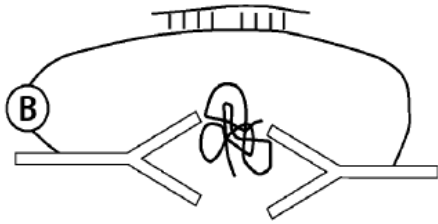
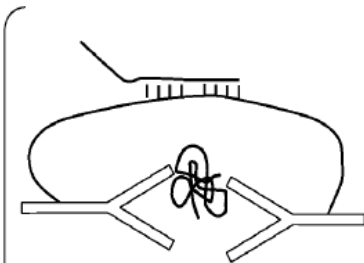
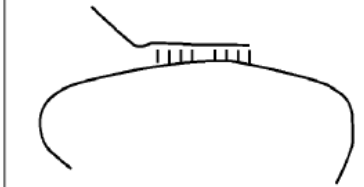


Fig. 8B



5) El oligo puente tiene una marcación de purificación (secuencia o biotina)



6) Liberación del oligo (a través de reducción de disulfuro, escisión de uracilo, digestión de restricción, o proteinasa K, etc.)

7) Purificación de oligo señal a través de marcación (secuencia o biotina). Únicamente el oligo ligado tendrá suficiente traslape para permanecer hibridado con el oligo señal

8) Paso a través del ensayo nCounter normal

Fig. 8C

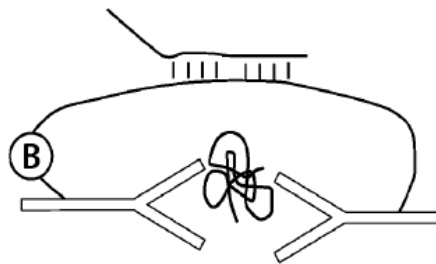


Fig. 8D

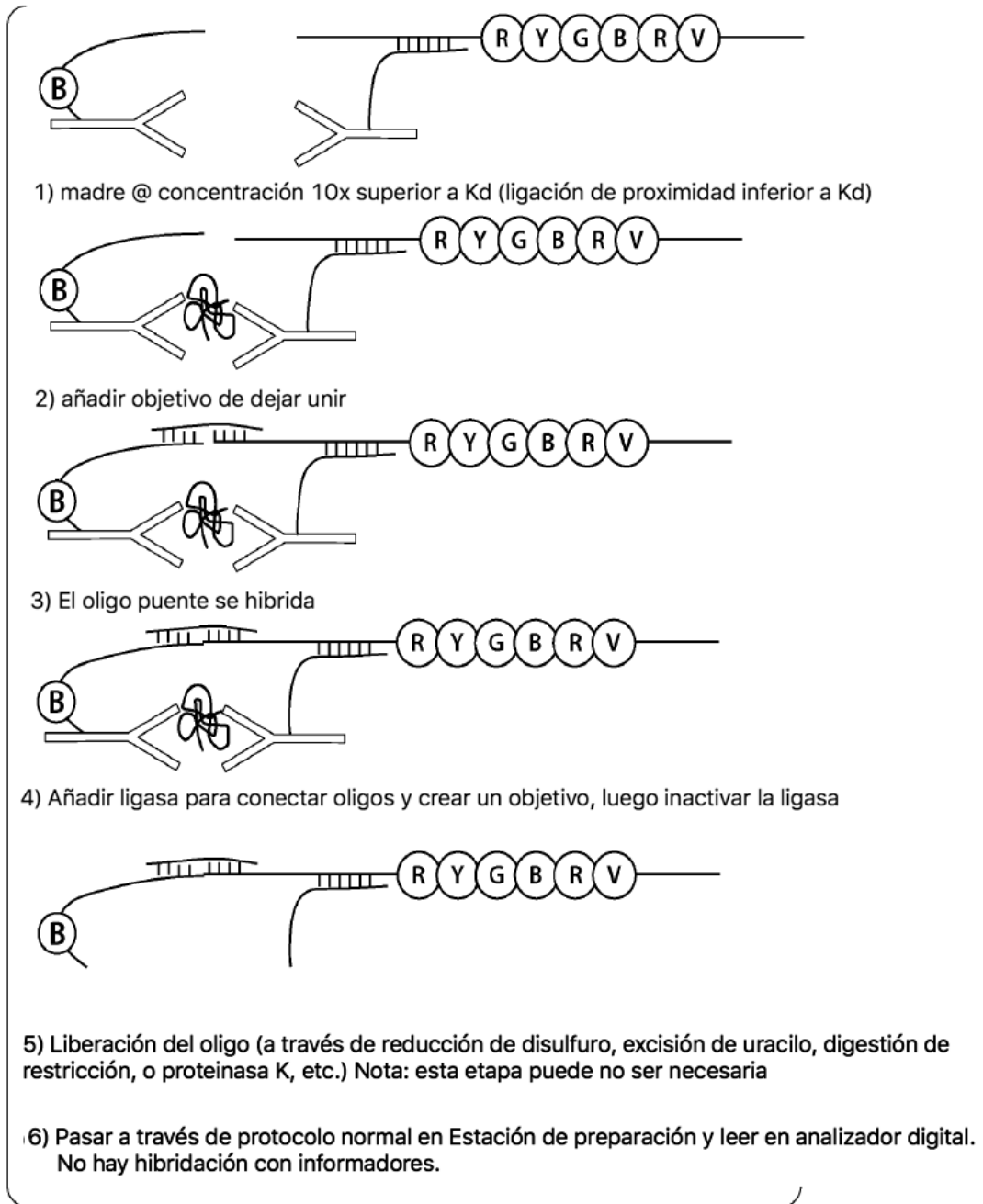


Fig. 9

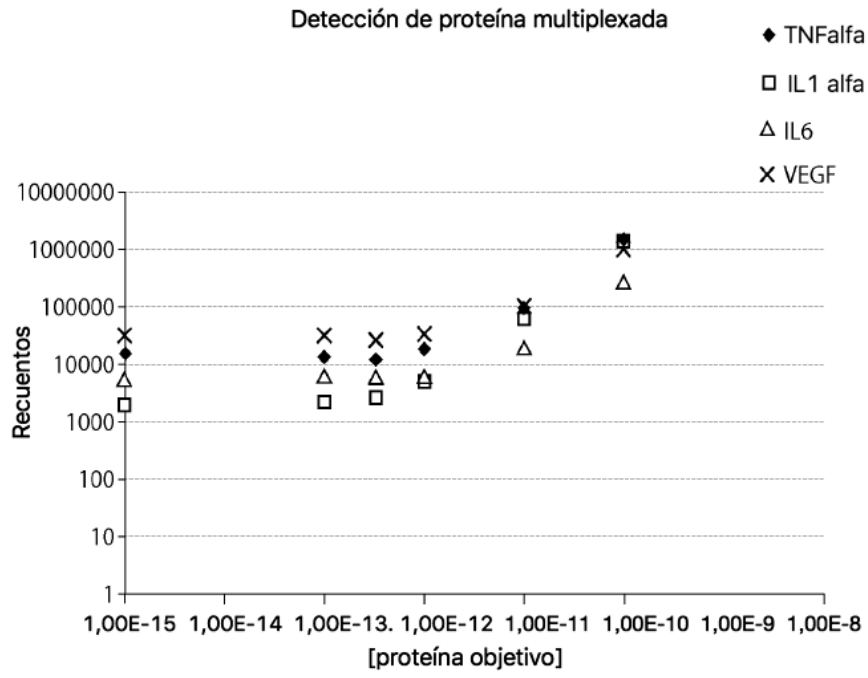


Fig. 10

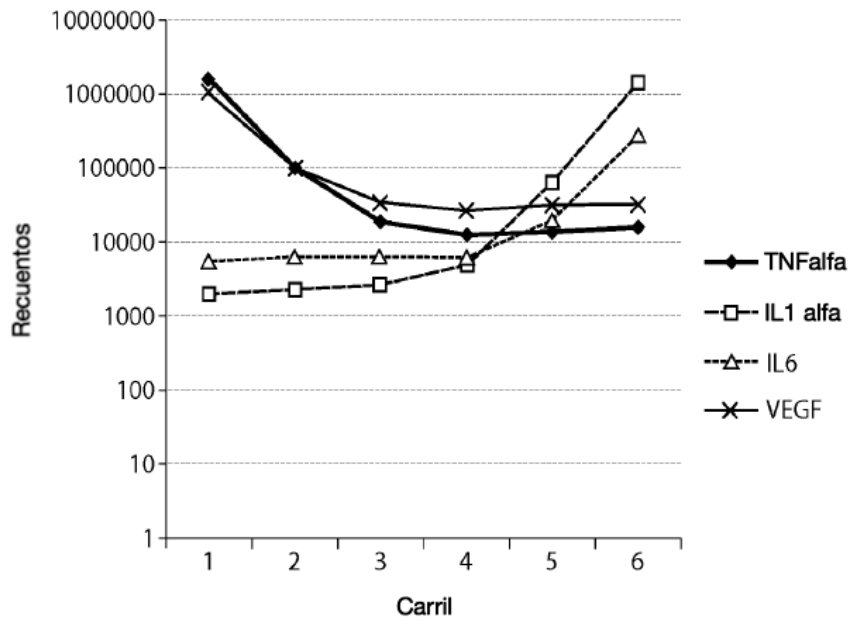


Fig. 11



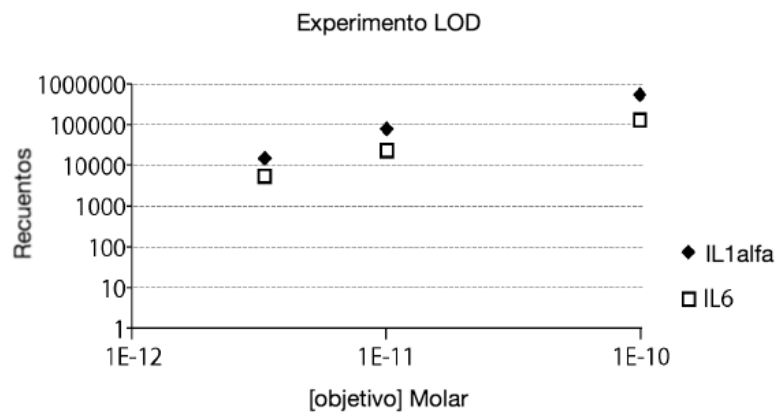


Fig. 12

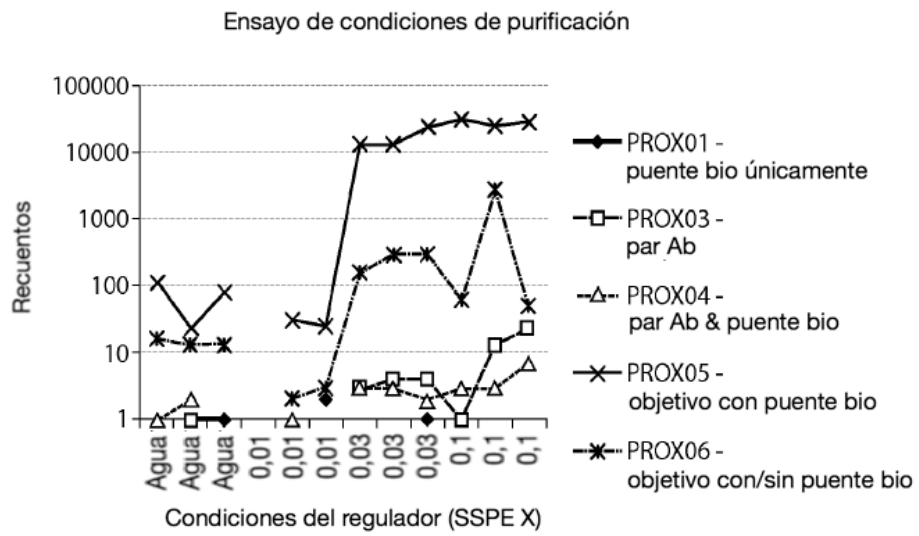


Fig. 13

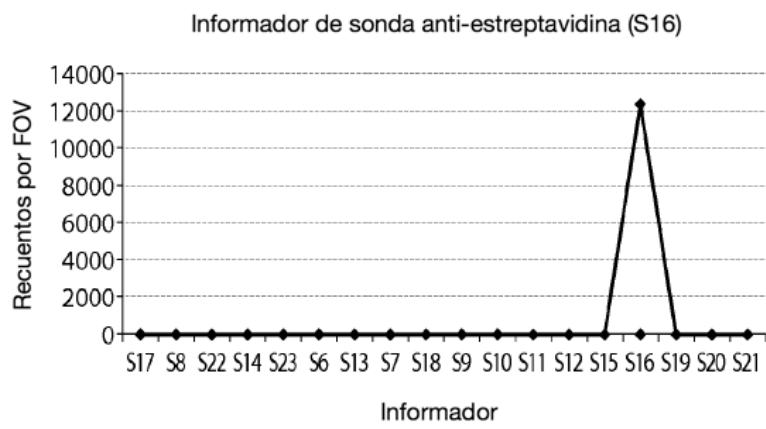


Fig. 14