

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 798**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2013** **PCT/US2013/035460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013** **WO13152295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2013** **E 13772909 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017** **EP 2836607**

54 Título: **Detección de la restricción de cadena ligera de inmunoglobulina por hibridación in situ de ARN**

30 Prioridad:

**05.04.2012 US 201261620634 P**

**22.10.2012 US 201261717064 P**

**15.03.2013 US 201313843408**

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

**19.03.2018**

73 Titular/es:

**ADVANCED CELL DIAGNOSTICS, INC. (50.0%)**

**7707 Gateway Blvd.**

**Newark, CA 94560, US y**

**THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MA, XIAO-JUN;**

**LUO, YULING y**

**TUBBS, RAYMOND**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 659 798 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 la restricción de cadena ligera de inmunoglobulina por hibridación *in situ* de ARN

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de Estados Unidos de n° de serie 13/843.408, presentada el 15 de marzo de 2013, y el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos de n° de serie 61/620.634, presentada el 5 de abril de 2012, y el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos de n° de serie 61/717.064, presentada el 22 de octubre de 2012.

## Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere en general a ensayos de hibridación *in situ*, y más específicamente a ensayos para diagnosticar neoplasias de linfocitos B.

Las inmunoglobulinas están compuestas por dos cadenas pesadas y dos ligeras. Durante la diferenciación de linfocitos B, el ADN que codifica los genes de inmunoglobulina experimenta reordenamiento, creando combinaciones únicas de dominios de inmunoglobulina que dan como resultado una gran diversidad de inmunoglobulinas posibles disponibles para el sistema inmunitario de un individuo. Cada linfocito B maduro expresa una combinación distinta de dominios de inmunoglobulina. Existen dos tipos de cadenas ligeras, designados  $\kappa$  (kappa) y  $\lambda$  (lambda). Durante la maduración de linfocitos B, los reordenamientos de ADN que aparecen dan como resultado que cada linfocito B maduro exprese una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera kappa o una cadena ligera lambda. Por tanto, en un linfocito B diferenciado dado, el linfocito B expresará una cadena ligera kappa o una cadena lambda. En un organismo mamífero normal, el organismo tendrá una población de linfocitos B que expresa individualmente cualquiera de las cadenas ligeras kappa o lambda, pero como población tendrá una mezcla de células que expresan la cadena ligera kappa y lambda. Tal población de células se considera que es policlonal.

Las células neoplásicas se caracterizan por un crecimiento celular desregulado. En el caso de una neoplasia de linfocitos B, el crecimiento celular desregulado de linfocitos B neoplásicos da como resultado una población de linfocitos B que incluye muchas copias de la misma célula. Puesto que un linfocito B maduro expresa en general cualquiera de las cadenas ligeras kappa o lambda, una población de linfocitos B neoplásicos exhibirá la característica de muchas copias de la misma célula y por lo tanto muchas copias de células que expresan solo cadena kappa o solo cadena ligera lambda. Tal población que contiene múltiples copias de la misma célula se considera que es clonal, y la clonalidad es característica del crecimiento celular aberrante de una célula neoplásica.

La expansión clonal es por lo tanto uno de los distintivos de las malignidades de linfocitos B, y se manifiesta lo más comúnmente como una expresión restringida de la cadena ligera de inmunoglobulina (Ig) (kappa o lambda) (Cook, "Molecular Hematopathology," Tubbs & Stoler, eds., en *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*, Churchill Livingstone Elsevier (2008)). La detección en laboratorio clínico de la restricción de cadena ligera de Ig (LCR) es una herramienta auxiliar útil en el diagnóstico diferencial que incluye hiperplasia linfoide, hiperplasia linfoide atípica, inflamación crónica y neoplasia de linfocitos B (Cook, *supra*, 2008; Taylor, *Applied Immunohistochem. Mol. Morphology* 17: 470-482 (2009a); Taylor, *Applied Immunohistochem. Mol. Morphology* 17: 366-374 (2009b)).

La demostración de las cadenas ligeras kappa y lambda por hibridación *in situ* cromogénica dual de biopsias de trefina de médula ósea fijadas con formalina, descalcificadas con ácido y embebidas en parafina se ha mostrado ya en la técnica anterior (Lang, *Journal of Histotechnology* 33: 9-13 (2010)) pero sin detección de IGLL5.

La identificación de LCR por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* cromogénica (CISH) convencional es factible para neoplasias de linfocitos B que expresan abundante ARNm de kappa o lambda y proteína inmunoglobulina citoplasmática (Beck et al., *Diagnostic Mol. Pathol.* 12: 14-20 (2003)). La LCR de mieloma de células plasmáticas es casi siempre factible en tejido embebido con parafina fijado con formalina (FFPE). Pero solo subconjuntos poco comunes de linfomas no de Hodgkin (NHL), los pocos con ARNm de Ig y expresión de proteína abundantes, son evaluables mediante estos métodos tradicionales (Beck et al., *supra*, 2003). A la inversa, la hibridación *in situ* autorradiográfica es suficientemente sensible para detectar los muy bajos niveles de ARNm de cadena ligera en un muy alto porcentaje de NHL de todos los subtipos (Segal et al., *Diagnostic Mol. Pathol.: Am. J. Surg. Pathol.*, parte B, 3: 170-177 (1994)), incluyendo las variantes de NHL más comunes: linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B pequeños y linfoma de zona marginal extranodal de tipo TLAM. Pero se requieren dos semanas o más para revelar las señales autorradiográficas (Segal et al., *supra*, 1994), un retraso que es inaceptable para uso en la gestión clínica.

Por tanto, existe la necesidad de ensayos precisos y rápidos para la identificación de muestras de linfocitos B benignas y cancerosas. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas también.

## Compendio de la invención

La invención proporciona un método para detectar la restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y la clonalidad en linfocitos B. El método puede incluir las etapas de obtener una muestra de linfocitos B de un sujeto; realizar uno o más ensayos de hibridación *in situ* en la muestra usando (i) al menos un conjunto de sondas que se diseña para

- 5 hibridar específicamente con ARN de la región constante de cadena kappa de inmunoglobulina (IGKCR); (ii) al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN de la región constante de cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR) y, opcionalmente, (iii) al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN del polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina (IGLL5); detectar la señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada, la señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada y la señal asociada a la sonda de IGLL5 hibridada en una población de linfocitos B en la muestra y determinar el patrón de señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada, la sonda de IGLCR hibridada y la sonda de IGLL5 hibridada en células individuales de la población de linfocitos B, en el que el patrón de señal en células individuales indica la presencia o ausencia de restricción de cadena ligera y clonalidad de los linfocitos B.
- 10 **Breve descripción de los dibujos**
- La presentación de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Se proporcionarán copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color por la Oficina tras la petición y el pago de la tasa necesaria.
- 15 Las Figuras 1A y 1B muestran ejemplos de un ensayo de hibridación *in situ* que exhibe una clara expresión de cadena ligera restringida en linfomas restringidos a kappa (Patrón 1, Figura 1A, panel izquierdo) y restringidos a lambda (Patrón 2, Figura 1B, panel derecho), donde se expresaba una de las dos cadenas ligeras en células tumorales.
- La Figura 2 muestra un ensayo de hibridación *in situ* en que se detectaron señales tanto de kappa (panel izquierdo) como de lambda (panel derecho).
- 20 Las Figuras 3A-3C muestran un ensayo de hibridación *in situ* en que se detectaron señales tanto de kappa como de lambda. La Figura 3A muestra tinción de kappa y la Figura 3B muestra tinción de lambda. La Figura 3C muestra el tratamiento con ARNasa A y el uso de una sonda de lambda.
- La Figura 4 muestra un diagrama esquemático de una porción del cromosoma humano 22 en una región que codifica la cadena ligera lambda de Ig.
- 25 Las Figuras 5A-5D muestran la tinción de secciones de tejido con sondas de lambda e IGLL5. Las Figuras 5A y 5B muestran la tinción de secciones de tejido adyacentes con sondas de lambda e IGLL5, respectivamente. Las Figuras 5C y 5D muestran un ensayo duplexado que usa sondas de lambda e IGLL5 detectadas por fluorescencia o un ensayo cromogénico, respectivamente.
- 30 La Figura 6 muestra un ensayo de hibridación *in situ* de linfoma de linfocitos B, donde estaban presentes ambas señales de kappa y lambda en las mismas células. Se tiñeron las muestras de tejido con kappa (panel superior izquierdo), lambda (panel superior derecho), IGLL5 (panel inferior izquierdo) o tinción duplexada con kappa (DAB, tinción marrón) y lambda (Fast Red, tinción roja) (panel inferior derecho).
- La Figura 7 muestra un ensayo de hibridación *in situ* que muestra señales de kappa y lambda en células diferentes. Se practicó la tinción duplexada con sondas de kappa (teñida con Deep Space Black, tinción negra) y lambda (Fast Red, tinción roja).
- 35 La Figura 8 muestra un esquema para la determinación de la restricción de cadena ligera basado en los patrones de expresión de ARNm de kappa, lambda e IGLL5. Los números 1-5 corresponden a 5 patrones de expresión observados.
- 40 La Figura 9 muestra configuraciones de sonda ejemplares para detectar ácidos nucleicos diana tales como ARNm de región constante de cadena ligera kappa de inmunoglobulina (IGKCR), ARNm de región constante de cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR) o polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina (IGLL5).

#### Descripción detallada de la invención

- 45 La presente invención se refiere a métodos para detectar la restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y la clonalidad de linfocitos B. Los métodos de la invención proporcionan ensayos altamente sensibles que son útiles para identificar linfocitos B neoplásicos. Los métodos de la invención pueden usarse también para distinguir e identificar linfocitos B neoplásicos que se habrían caracterizado en general como benignos usando análisis de restricción de cadena ligera de inmunoglobulina tradicionales. Los métodos de la invención pueden usarse por lo tanto en aplicaciones de diagnóstico para proporcionar mayor confianza en la validez de ensayos de diagnóstico para la valoración de neoplasia de linfocitos B.
- 50 Se ha desarrollado una plataforma de tecnología de ISH de ARN llamada RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics, Inc.; Hayward CA) que tiene sensibilidad de molécula única, es capaz de detección múltiple y es compatible con tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE) (véanse, por ejemplo, Masand *et al.*, 5: 108-116 (2011); Ukpo *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.* 35: 1343 (2011); Wang *et al.*, *J. Mol. Diagnostics* 14: 22-29 (2012)). RNAscope® representa un avance tecnológico fundamental en la morfología molecular y proporciona numerosas aplicaciones en

patología del diagnóstico, especialmente aquellos ensayos basados en sección de tejido que deben detectar niveles muy bajos de ARNm. Como se divulga en la presente memoria, se utilizó RNAscope® para la detección de restricción de cadena ligera (LCR) en linfocitos B y se encontró que proporciona resultados y sensibilidad superiores frente a métodos anteriores de análisis de LCR. Como se divulga adicionalmente en la presente memoria, la aplicación de RNAscope® a la detección de LCR procuraba un patrón de tinción más complejo que la simple restricción de cadena kappa y lambda. El análisis de estos patrones permitió el desarrollo de un ensayo y un algoritmo de interpretación para determinar precisamente la LCR, y por tanto la clonalidad de linfocitos B (véase el Ejemplo).

Las neoplasias del sistema inmunitario son un grupo heterogéneo de tumores de diversos orígenes celulares. Los linfomas no de Hodgkin (NHL) son el mayor grupo único de neoplasias del sistema inmunitario. En el caso de neoplasias de linfocitos B, las características de la neoplasia dependen del tipo de neoplasia, incluyendo el estado de desarrollo de linfocitos B asociado a la neoplasia. El origen celular de la neoplasia puede asociarse a un estado de desarrollo de linfocitos B y es en general un linfocito B medular, linfocito B folicular o linfocito B inmunoblástico (véanse *Cecil Textbook of Medicine*, 20ª ed., Bennet and Plum, eds., WB Saunders, Filadelfia, PA (1996); *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14ª ed., Fauci et al., eds., McGrawHill, Nueva York (1998)). Los linfomas de linfocitos B pueden clasificarse basándose en el grado (según la supervivencia a 5 años) e incluyen, por ejemplo, linfomas de bajo grado tales como linfoma linfocítico pequeño (LLP), linfoma folicular de células pequeñas escindidas (LFPE), linfoma folicular mixto de células pequeñas escindidas y células grandes (LFM) y tejido linfoide asociado a mucosa (TLAM); linfomas de grado intermedio tales como linfoma folicular de células grandes (LFCG), linfoma difuso de células pequeñas escindidas (LDPE), linfoma difuso mixto de células pequeñas escindidas y células grandes (LDM), linfoma difuso de células grandes (escindidas y no escindidas) (LDCG) y linfomas de alto grado tales como linfoma inmunoblástico de células grandes (LIB) y linfoma de células pequeñas no escindidas (de Burkitt y no de Burkitt) (LCPN).

Se ha logrado establecer tradicionalmente la clonalidad de la proliferación de linfocitos B mediante la demostración de una única clase de inmunoglobulina de superficie celular de cadena pesada y/o ligera. A nivel de ADN, la clonalidad puede confirmarse por la presencia de una única reordenación génica de inmunoglobulina. En neoplasias de linfocitos B precursores, que carecen de inmunoglobulinas de superficie, se han necesitado estudios de reordenación génica para demostrar la clonalidad. Los métodos de ensayo tradicionales para establecer la clonalidad han incluido citometría de flujo y/o inmunohistoquímica basada en la expresión en superficie de inmunoglobulinas u otros marcajes de superficie celular o ensayos de detección basados en ácido nucleico tales como hibridación *in situ* o ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como se discute en la presente memoria, es un distintivo de la clonalidad de linfocitos B la restricción de la expresión de cadenas ligeras kappa o lambda. La presente invención se refiere al uso de un ensayo de hibridación *in situ* exquisitamente sensible que permite una detección altamente precisa y rápida de restricción de cadena ligera de inmunoglobulina, que puede usarse en el diagnóstico de neoplasias de linfocitos B.

Los ensayos de la invención son útiles en aplicaciones clínicas, particularmente en neoplasias de linfocitos B. La determinación precisa de LCR y clonalidad de linfocitos B por el ensayo y algoritmo de la invención, como se describen en la presente memoria, es útil para el diagnóstico de enfermedades proliferativas de linfocitos B, permitiendo la discriminación de neoplasias de linfocitos B (poblaciones de linfocitos B clonales) de enfermedades proliferativas de linfocitos B benignas (policlonales). Los métodos de la invención son particularmente beneficiosos en la distinción de una muestra que contiene patrones de tinción de linfocitos B aparentemente policlonales que se habrían identificado tradicionalmente como negativos o indeterminados de una muestra que contiene células que tienen tinción tanto de kappa como de lambda que son monoclonales, es decir, neoplásicas.

Además, la invención proporciona adicionalmente ensayos y algoritmos para la discriminación de patrones anteriormente no reconocidos de diversas expresiones de kappa/lambda/IGLL5 que tienen significación clínica potencial. Se ha mostrado que la expresión de proteína de cadena ligera dual determinada por citometría de flujo está asociada a linfoma de linfocitos B agresivo (Fujiwara et al., *Internal Med.* 46: 1458-1461 (2007)). Es posible que los diferentes patrones de expresión de ARNm de kappa/lambda/IGLL5 sean biomarcadores de diferentes subtipos de linfoma de linfocitos B que pueden tener distintos pronósticos y/o respuestas a terapias. Por tanto, los métodos de la invención pueden usarse para identificar subtipos de linfomas de linfocitos B y/o para predecir o monitorizar la respuesta ante terapias de linfoma de linfocitos B.

Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico" o como alternativa el término "polinucleótido" hace referencia a un polímero de unidades monoméricas nucleotídicas, como es bien conocido por los especialistas en la materia. Los ácidos nucleicos ejemplares incluyen, por ejemplo, ADN y ARN, incluyendo ARNm, ARNip, ARNhn, ADN genómico, ADNc u otras formas bien conocidas de ácidos nucleicos. El ácido nucleico o polinucleótido puede contener nucleótidos de origen natural, incluyendo modificaciones nucleotídicas de origen natural bien conocidas, así como nucleótidos de origen no natural tales como aquellos elaborados por síntesis químicas. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitación, ácidos peptidonucleicos (APN), oligonucleótidos modificados, por ejemplo oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no son típicos de ARN o ADN biológico, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados y similares. Los nucleótidos del polinucleótido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos nucleotídicos, pueden ser naturales o no naturales y pueden ser no sustituidos, no modificados, sustituidos o modificados. Los nucleótidos pueden estar ligados por enlaces fosfodiéster o por

ligamientos fosforotioato, ligamientos metilfosfonato, ligamientos boranofosfato o similares. El polinucleótido puede comprender adicionalmente elementos no nucleotídicos tales como marcajes, inactivadores, grupos bloqueantes o similares, como se divulga en la presente memoria. El polinucleótido puede ser monocatenario o bicatenario.

Como se usa en la presente memoria, una “diana de ácido nucleico” o “ácido nucleico diana” hace referencia a un ácido nucleico, o una región del mismo, que se pretende detectar. Un especialista en la materia puede determinar fácilmente los ácidos nucleicos diana que se desea detectar mediante los métodos de la invención. Como se describe en la presente memoria, la invención se refiere a métodos de detección de restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y de clonalidad en linfocitos B. En los métodos de la invención, el ácido nucleico diana es en general ARNm de la región constante de cadena kappa de inmunoglobulina (IGKCR), ARNm de la región constante de cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR) y polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina (IGLL5). Un especialista en la materia puede diseñar fácilmente sondas adecuadas para detectar IGKCR, IGLCR e IGLL5 usando métodos bien conocidos de diseño de sonda y secuencias disponibles en bases de datos públicas. Pueden encontrarse secuencias de IGKCR ejemplares en el n° de acceso a GenBank AF026381.1 (GI:3169769). Pueden encontrarse secuencias de IGLCR ejemplares en los n° de acceso a GenBank U07991.1 (GI:468246) y HF541912.1 (GI:444737700). Pueden encontrarse secuencias de IGLL5 ejemplares en los n° de acceso a GenBank NM\_001178126.1 (GI:295986607) y NM\_001256296.1 (GI:372466585). Están disponibles otras secuencias ejemplares de IGKCR, IGLCR y/o IGLL5 en bases de datos públicas tales como GenBank de NCBI o EMBL y pueden usarse también. Si se desea, las sondas pueden tener en cuenta las reordenaciones de ADN que aparecen durante el desarrollo de linfocitos B, incluyendo la selección de sondas en exones particulares.

Como se usa en la presente memoria, un “marcaje” es un resto que facilita la detección de una molécula. Los marcajes comunes en el contexto de la presente invención incluyen marcajes fluorescentes, luminiscentes, de dispersión de luz y/o colorimétricos. Los marcajes adecuados incluyen enzimas y restos fluorescentes y cromogénicos, así como radionucleidos, sustratos, cofactores, inhibidores, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. En una realización particular de la invención, el marcaje es una enzima. Los marcajes enzimáticos ejemplares incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP),  $\beta$ -galactosidasa, glucosa oxidasa y similares, así como diversas proteasas. Otros marcajes incluyen, pero sin limitación, fluoróforos, dinitrofenilo (DNP) y similares. Los marcajes son bien conocidos por los especialistas en la materia como se describen, por ejemplo, en Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) y en las patentes de EE.UU. n° 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241. Están comercialmente disponibles muchos marcajes y pueden usarse en métodos y ensayos de la invención, incluyendo combinaciones de enzima/sustrato detectables (Pierce, Rockford IL; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX; Invitrogen, Carlsbad CA). En una realización particular de la invención, la enzima puede utilizar un sustrato cromogénico o fluorogénico para producir una señal detectable, como se describe en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, “hibridación *in situ*” o “ISH” hace referencia a un tipo de hibridación que usa una hebra de ADN o ARN complementaria marcada directa o indirectamente, tal como una sonda, para unirse a y localizar un ácido nucleico específico, tal como ADN o ARN, en una muestra, en particular una porción o sección de tejido (*in situ*). Los tipos de sonda pueden ser ADN bicatenario (ADNbc), ADN monocatenario (ADNmc), ARN complementario monocatenario (ARNcmc), ARN mensajero (ARNm), microARN (miARN) y/u oligonucleótidos sintéticos. El término “hibridación *in situ* fluorescente” o “FISH” hace referencia a un tipo de ISH que utiliza un marcaje fluorescente. El término “hibridación *in situ* cromogénica” o “CISH” hace referencia a un tipo de ISH con un marcaje cromogénico. Los métodos de ISH, FISH y CISH son bien conocidos por los especialistas en la materia (véanse, por ejemplo, Stoler, *Clinics in Laboratory Medicine* 10(1): 215-236 (1990); *In situ hybridization. A practical approach*, Wilkinson, ed., IRL Press, Oxford (1992); Schwarzbacher y Heslop-Harrison, *Practical in situ hybridization*, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford (2000)).

Como se usa en la presente memoria, la frase “restricción de cadena ligera de inmunoglobulina” hace referencia a la expresión de la cadena ligera kappa o lambda en un linfocitos B. A medida que el linfocito B madura y experimenta reordenaciones de ADN para producir una inmunoglobulina particular, la expresión de la cadena ligera se vuelve restringida a kappa o lambda, pero no ambas. La restricción de cadena ligera de inmunoglobulina es bien conocida por los especialistas en la materia, particularmente en el campo de la hematopatología y el diagnóstico de neoplasias de linfocitos B (véanse, por ejemplo, Knowles, *Neoplastic Hematopathology*, 2ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia PA (2001); Lehmen *et al.*, *Am. J. Pathol.* 159: 2023-2029 (2001); Arber, *J. Mol. Diagnostics* 2: 178-190 (2000); Plank *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* 103: 330-337 (1995)). La LCR es un distintivo altamente reconocido de linfomas de linfocitos B, pero se ha reseñado la existencia de expresión de cadena ligera no restringida, es decir, expresión de ambas cadenas kappa y lambda, en los mismos linfocitos B en casos raros de neoplasias de linfocitos B (Xu, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130: 853-856 (2006)).

Como se usa en la presente memoria, el término “clon” hace referencia a un grupo de células producidas por división celular a partir de una única célula. Como se usa en la presente memoria, el término “clonalidad”, cuando se usa con referencia a un linfocito B, hace referencia a una población de linfocitos B producidos por división celular a partir de un linfocito B parental. La detección de clonalidad es una herramienta estándar en la determinación de linfocitos B neoplásicos en el campo de la hematopatología. La detección de clonalidad de linfocitos B es bien conocida por los especialistas en la materia, particularmente en el campo de la hematopatología y el diagnóstico de neoplasias de

linfocitos B (véanse, por ejemplo, Knowles, *Neoplastic Hematopathology*, 2ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia PA (2001); Lehmen *et al.*, *Am. J. Pathol.* 159: 2023-2029 (2001); Arber, *J. Mol. Diagnostics* 2: 178-190 (2000); Plank *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* 103: 330-337 (1995)).

Como se usa en la presente memoria, la frase "patrón de señal" hace referencia a una característica observable en una población de células medida por una señal detectable. En aspectos de la invención, cuando se detectan ácidos nucleicos, la señal está asociada a un método de detección de ácido nucleico, por ejemplo un marcaje como se divulga en la presente memoria. Como se describe en la presente memoria, pueden usarse patrones mensurables y distintos de señal en una población de células para correlacionar con un fenotipo normal o neoplásico de una población de linfocitos B.

En una realización, la invención proporciona un método para detectar restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y clonalidad en linfocitos B. El método puede incluir las etapas de obtener una muestra de linfocitos B de un sujeto; realizar un ensayo de hibridación *in situ* doble en la muestra usando (i) al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN de la región constante de cadena kappa de inmunoglobulina (IGKCR) y (ii) al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN de la región constante de cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR); detectar la señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada y la señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada en una población de linfocitos B en la muestra y determinar el patrón de señal asociado a la sonda de IGLCR hibridada y la sonda de IGLCR hibridada en las células individuales en la población de linfocitos B, en el que el patrón de señal en las células individuales indica la presencia o ausencia de restricción de cadena ligera y clonalidad de los linfocitos B.

Como se divulga en la presente memoria, los métodos de la invención utilizan un ensayo *in situ* altamente sensible para detectar restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y clonalidad de linfocitos B. Debido a la alta sensibilidad del ensayo, la expresión de IGKCR e IGLCR puede medirse al nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual. Por lo tanto, los ensayos son aplicables para la identificación de la clonalidad de linfocitos B que podrían de otro modo haberse pasado por alto y clasificado como benignos y son particularmente útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como se divulga en la presente memoria, se ha determinado que el patrón de señal asociado a las sondas de IGKCR e IGLCR, así como a las sondas de IGLL5, indica la presencia de restricción de cadena ligera y clonalidad de los linfocitos B en una muestra.

El patrón en los linfocitos B individuales de solo señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada indica restricción a kappa en la muestra. Aunque este patrón se entendía anteriormente que indicaba restricción a kappa, los métodos de la invención proporcionan una detección altamente sensible hasta el nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual. El patrón en linfocitos B individuales de solo señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada indica restricción a lambda en la muestra. De forma similar, aunque este patrón se entendía anteriormente que indicaba restricción a lambda, los métodos de la invención proporcionan una detección altamente sensible hasta el nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual.

El patrón de detección tanto de señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada como de señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada en linfocitos B separados en la población indica que la muestra es policlonal. Aunque este patrón se entendía anteriormente que indicaba policlonalidad, los métodos de la invención proporcionan una detección altamente sensible hasta el nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual. El patrón de tanto señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada como señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada en los mismos linfocitos B indica que la muestra es monoclonal. De nuevo, el método de la invención proporciona la capacidad de detectar patrones de expresión al nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual. Los métodos anteriores no habrían podido hacer eso, y en la situación en que se detectan tanto sonda de kappa como de lambda en una muestra, tal muestra se habría indicado probablemente como muestra de célula policlonal negativa, porque la detección de expresión de ambas cadenas ligeras kappa y lambda en una muestra es un signo de policlonalidad, es decir, de una muestra de linfocito B normal. Sin embargo, se descubrió sorprendentemente usando los ensayos muy sensibles de la invención que una población celular con un patrón de señales positivas para la expresión de ARNm tanto de cadena ligera lambda como kappa puede de hecho ser clonal. Los métodos de la invención son por lo tanto capaces de discriminar tal falso negativo e identificar correctamente que la muestra contiene una población de linfocitos B clonales. Por tanto, la invención proporciona métodos que permiten diagnósticos más precisos y una eliminación significativa de falsos negativos o ambigüedades. Tal sorprendente observación puede aplicarse clínicamente para eliminar falsos negativos y resolver ambigüedades debido a los ensayos muy sensibles de la invención, que pueden medir señales asociadas a sondas de kappa y lambda al nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual. Tales métodos son particularmente útiles para diagnosticar neoplasias de linfocitos B humanos.

La invención proporciona un método para detectar restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y clonalidad en linfocitos B. Tal método puede incluir las etapas de obtener una muestra de linfocitos B de un sujeto; realizar uno o más ensayos de hibridación *in situ* en la muestra usando (i) al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN de la región constante de cadena kappa de inmunoglobulina (IGKCR); (ii) al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN de la región contante de

cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR) y (iii) al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN del polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina (IGLL5); detectar la señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada, la señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada y la señal asociada a la sonda de IGLL5 hibridada en una población de linfocitos B en la muestra; y determinar un patrón de señal asociado a la sonda de IGKCR hibridada, la sonda de IGLCR hibridada y la sonda de IGLL5 hibridada en células individuales de la población de linfocitos B, en el que el patrón de señal en células individuales indica la presencia o ausencia de restricción de cadena ligera y clonalidad de linfocitos B.

En una realización de un método de la invención, el uno o más ensayos de hibridación *in situ* pueden realizarse como reacciones monoplexadas en secciones en serie. En tal caso, se usan las sondas de IGKCR, IGLCR e IGLL5 en ensayos de hibridación *in situ* separados y se miden las señales asociadas independientemente, generalmente en secciones en serie. Como alternativa, la hibridación del conjunto de sondas de IGKCR y del conjunto de sondas de IGLCR puede realizarse en el mismo ensayo de hibridación *in situ*. Aunque opcionalmente es posible practicar un ensayo triplexado que incluya el conjunto de sondas de IGLL5 en el mismo ensayo de hibridación, generalmente la hibridación del conjunto de sondas de IGLL5 se practica en un ensayo de hibridación *in situ* separado del ensayo en que se hibridan el conjunto de sondas de IGKCR y el conjunto de sondas de IGLCR.

Como es bien conocido en la materia, pueden incluirse opcionalmente controles negativos apropiados en un ensayo de hibridación. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de hibridación usando al menos un conjunto de sondas de control negativo. El uso y diseño de los controles negativos para uso en un ensayo de hibridación *in situ* son bien conocidos por los especialistas en la materia. Los controles negativos particularmente útiles incluyen aquellos que no hibridarían en particular con un linfocito B que se está caracterizando. Tal control negativo puede basarse por lo tanto en sondas que hibridan con secuencias conocidas por no expresarse en un linfocito B, por ejemplo sondas específicas de tejido. Un control negativo particularmente útil sería una sonda que se diseña para un organismo completamente diferente, en particular un organismo no mamífero, y más particularmente un organismo no eucariótico tal como una bacteria. Un especialista en la materia sabrá fácilmente cómo seleccionar controles negativos apropiados adecuados para un ensayo de hibridación *in situ*.

En un método de la invención que utiliza IGKCR, IGLCR e IGLL5, puede usarse el método para discriminar adicionalmente falsos negativos, proporcionando por lo tanto ensayos incluso más precisos que los métodos tradicionales para detectar clonalidad de linfocitos B. El patrón en linfocitos B individuales de solo señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada indica restricción a kappa en la muestra. Como se discute anteriormente, este patrón era conocido pero puede determinarse al nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual usando los métodos de la invención. El patrón de linfocitos B individuales de solo señal asociada a sonda de IGLCR hibridada indica restricción a lambda en la muestra. De forma similar, este patrón era conocido pero puede determinarse al nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución especial de una célula individual usando los métodos de la invención. El patrón de detección tanto de señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada como de señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada en linfocitos B separados indica que la muestra es policlonal. De nuevo, este patrón era conocido pero puede determinarse al nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual usando los métodos de la invención.

El patrón de tanto señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada como señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada en el mismo linfocito B indica que la muestra es policlonal. Como se discute anteriormente, la observación de este patrón de señal permite la discriminación de una población de linfocitos B clonal, y por lo tanto neoplásica, que con los métodos anteriores se habría identificado probablemente como policlonal y por lo tanto negativa de células neoplásicas. Por tanto, la capacidad de los métodos de la invención de discriminar este patrón de detección de sondas hibridadas con IGKCR e IGLCR en la misma célula da como resultado una reducción de las determinaciones de falsos negativos y un ensayo de mayor precisión.

Como se describe anteriormente, la alta sensibilidad de los métodos de la invención conducía a observaciones inesperadas adicionales respecto a los patrones de señal asociados a sondas de IGKCR, IGLCR e IGLL5. Tales observaciones proporcionan una reducción adicional de los falsos negativos. Según la invención, el patrón donde están presentes tanto señal asociada a la sonda de IGKCR como señal asociada a la sonda de IGLCR en el mismo linfocito B, y donde el nivel de señal asociada a la sonda de IGLL5 hibridada es mayor o igual al nivel de señal asociado a la sonda de IGLCR hibridada, indica restricción a kappa. Esta observación está basada en el reconocimiento de que, en algunas situaciones, una señal aparentemente asociada a sondas de lambda se refiere realmente a hibridación cruzada con IGLL5. Puesto que IGLL5 aparece en el gen de lambda no reordenado, las células están de hecho restringidas a kappa y son clonales. De nuevo, la alta sensibilidad de los métodos de ensayo de la invención proporciona una reducción de los falsos negativos.

Según la invención, el patrón donde están presentes tanto señal asociada a la sonda de IGKCR como señal asociada a la sonda de IGLCR en el mismo linfocito B, y donde el nivel de señal asociada a la sonda de IGLL5 hibridada es menor que el nivel de señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada, indica una muestra clonal no restringida. Esta observación era también sorprendente y obtenible basándose en la alta sensibilidad de los ensayos de la invención (véase el Ejemplo). Como se discute en la presente memoria, la restricción de cadena ligera de inmunoglobulina se usa como distintivo de la clonalidad de linfocitos B y en la determinación de neoplasias. La observación de que un linfocito B no restringido era de hecho clonal era sorprendente, y de nuevo proporciona una

situación donde una muestra que es probable que se haya identificado como negativa debido a su no restricción sea de hecho una muestra clonal no restringida.

Los métodos de la invención han permitido el desarrollo de un algoritmo para determinar la restricción de cadena ligera y la clonalidad a un mayor nivel de precisión (véase el Ejemplo y la Figura 8). Brevemente, se analiza un espécimen mediante los métodos de la invención, que proporcionan una sensibilidad de detección hasta el nivel de una molécula única y una resolución espacial hasta el nivel de una célula individual. Esta detección de alta sensibilidad, que es significativamente más sensible que los métodos anteriores, ha proporcionado conocimientos sobre la estratificación anteriormente no reconocida de las poblaciones de linfocitos B que son clonales, pero que se habrían caracterizado de otro modo por métodos de ensayo anteriores como policlonales y por lo tanto benignas. Los métodos de la invención pueden usarse para visualizar células individuales e incluso moléculas de ácido nucleico individuales en las células. En el caso del análisis de linfocitos B tradicional, la presencia de células clonales restringidas a kappa (Figura 8, patrón 1), células clonales restringidas a lambda (Figura 8, patrón 2) y células policlonales que expresan individualmente kappa o lambda, pero como población tienen ambas expresiones de kappa y lambda (Figura 8, patrón 5), se ha usado para determinar la restricción de inmunoglobulina y la clonalidad de linfocitos B.

Debido al alto nivel de sensibilidad de los métodos de la invención, se identificaron patrones adicionales no observados anteriormente. Estos patrones adicionales se refieren a poblaciones clonales que exhiben tanto señales de sonda de kappa como de lambda, que probablemente se habrían determinado como poblaciones policlonales benignas usando los métodos de ensayo anteriores. A nivel de célula individual, se observaron tanto señales de kappa como de lambda en la misma célula (Figura 8, patrones 3 y 4). A la menor resolución de los ensayos anteriores, la presencia de ambas señales de kappa y lambda se habría caracterizado probablemente como una población celular policlonal benigna. Los métodos de la invención proporcionan la capacidad de discriminar estas poblaciones clonales de las poblaciones policlonales. En un patrón (patrón 3), se encontró que la presencia de señal de kappa y de lambda estaba causada por una hibridación cruzada con polipéptido 5 de tipo inmunoglobulina (IGLL5). Esta proteína se expresa a partir de ADN de lambda no reordenado. Por lo tanto, aunque la señal corresponde a sondas de lambda hibridadas, las células no expresan lambda reordenado, sino que están realmente restringidas a kappa. Esto puede distinguirse determinando la expresión relativa de IGLL5 y lambda. En el patrón 3, se expresa IGLL5 a niveles mayores o iguales a la expresión de lambda, y la población celular está por lo tanto restringida a kappa y es clonal.

Además, se descubrió un patrón de expresión adicional usando los métodos de la invención. En este patrón adicional (patrón 4), se expresan tanto kappa como lambda. Este patrón puede distinguirse del patrón 3 al determinar de forma similar la expresión relativa de IGLL5 y lambda. En el patrón 4, la expresión de IGLL5 a niveles menores que lambda indica que la señal asociada a la sonda de lambda se corresponde con la expresión de lambda. Este patrón de expresión se corresponde con una población no restringida pero clonal de linfocitos B. Por tanto, los métodos de la invención proporcionan ensayos altamente sensibles que pueden usarse para estratificar adicionalmente poblaciones de linfocitos B e identificar precisamente poblaciones de linfocitos B que se habrían caracterizado como poblaciones policlonales benignas usando ensayos conocidos anteriormente. Los métodos de la invención son por lo tanto particularmente útiles como ensayos altamente precisos y altamente sensibles para detectar restricción de inmunoglobulina y clonalidad de linfocitos B y proporcionan una reducción significativa de los falsos negativos.

Los resultados divulgados en la presente memoria usando los métodos de la invención proporcionan una valoración altamente sensible y más precisa de las neoplasias de linfocitos B. Los métodos de la invención son capaces de discriminar e identificar linfocitos B clonales que son neoplásicos que se habrían clasificado probablemente como células policlonales negativas. Por tanto, los métodos de la invención proporcionan resultados superiores frente a ensayos anteriores para la detección de restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y clonalidad en linfocitos B. Los métodos de la invención pueden usarse por lo tanto en el diagnóstico de neoplasias de linfocitos B. La invención proporciona por lo tanto una realización de diagnóstico de una neoplasia de linfocitos B usando métodos de la invención, como se divulga en la presente memoria. Los métodos de la invención son particularmente útiles para valorar neoplasias en los tipos de linfocitos B que tienen baja expresión de cadenas ligeras y/o para las observaciones inesperadas descritas en la presente memoria de señales asociadas a expresión de kappa y lambda, ambas de las cuales habrían dado como resultado un falso negativo o un resultado clínico indiscriminado usando métodos anteriores.

Los métodos de la invención son también útiles para predecir y/o monitorizar los resultados clínicos terapéuticos del tratamiento de una afección neoplásica de linfocitos B. Basándose en la alta sensibilidad de los métodos de la invención, pueden usarse los métodos para monitorizar la progresión y/o remisión de la enfermedad. Esto puede ser particularmente útil puesto que los métodos de la invención son más sensibles que los métodos anteriores y pueden detectar señales de kappa y lambda al nivel de una única molécula de ácido nucleico y a la resolución espacial de una célula individual. Debido a que los métodos de la invención son más sensibles, pueden ser particularmente útiles para monitorizar la regresión de la enfermedad en respuesta al tratamiento, puesto que se esperaría que el número de linfocitos B neoplásicos fuera menor. Por tanto, en una realización adicional, la invención proporciona un método de monitorización de la reactividad a la terapia usando los métodos de la invención.

Como se divulga en la presente memoria, un método para practicar ensayos de hibridación *in situ* de la invención incluye el uso de un ensayo RNAscope®. Los ensayos de hibridación *in situ* RNAscope® están comercialmente disponibles en Advanced Cell Diagnostics, Inc. (Hayward CA). Los ensayos RNAscope® se han descrito anteriormente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.709.198, las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688 y los documentos WO 2007/001986 y WO 2007/002006. Los ensayos RNAscope® en diversas realizaciones se describen a continuación con más detalle. Se entiende que los ensayos de la invención pueden practicarse con ensayos de hibridación *in situ* RNAscope® comercialmente disponibles o variaciones de tales ensayos como se describe en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término “sonda marcadora” hace referencia a una entidad que se une a una molécula diana, directa o indirectamente, y permite detectar la diana. Una sonda marcadora (o “LP”) contiene una porción de unión a ácido nucleico que es típicamente un polinucleótido u oligonucleótido monocatenario que comprende uno o más marcajes que proporcionan directa o indirectamente una señal detectable. El marcaje puede estar enlazado covalentemente al polinucleótido, o el polinucleótido puede configurarse para unirse al marcaje. Por ejemplo, un polinucleótido biotinilado puede unirse a un marcaje asociado a estreptavidina. La sonda marcadora puede hibridar, por ejemplo, directamente con un ácido nucleico diana, tal como de IGKCR, IGLCR o IGLL5, o puede hibridar con un ácido nucleico que a su vez hibrida con el ácido nucleico diana o con uno o más ácidos nucleicos distintos que hibridan con el ácido nucleico diana. Por tanto, la sonda marcadora puede comprender una secuencia polinucleotídica que es complementaria de una secuencia polinucleotídica, particularmente una porción, del ácido nucleico diana. Como alternativa, la sonda marcadora puede comprender al menos una secuencia polinucleotídica que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en un amplificador, preamplificador, complejo intermedio o similar como se describe en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, una sonda marcadora que comprende un marcaje enzimático hace referencia a una sonda marcadora que comprende una porción de unión a ácido nucleico tal como un oligonucleótido y un marcaje enzimático o no enzimático que está acoplado con la porción de unión a ácido nucleico. Como se divulga en la presente memoria, el acoplamiento del marcaje enzimático o no enzimático con la porción de unión a ácido nucleico puede ser covalente o a través de una interacción de unión de alta afinidad tal como biotina/avidina u otras moléculas de unión de alta afinidad similares.

Como se usa en la presente memoria, una “sonda diana” es un polinucleótido que es capaz de hibridar con un ácido nucleico diana y capturar o unir una sonda marcadora o molécula de complejo intermedio con ese ácido nucleico diana. La sonda diana puede hibridar directamente con la sonda marcadora, o puede hibridar con uno o más ácidos nucleicos que a su vez hibridan con la sonda marcadora; por ejemplo, la sonda diana puede hibridar con un amplificador o preamplificador en un complejo intermedio. La sonda diana incluye por tanto una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria de una secuencia polinucleotídica del ácido nucleico diana y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria de una secuencia polinucleotídica de la sonda marcadora, amplificador, preamplificador o similar. La sonda diana es generalmente monocatenaria, de modo que la secuencia complementaria esté disponible para hibridar con el correspondiente ácido nucleico diana, sonda marcadora, amplificador o preamplificador.

Como se usa en la presente memoria, un “amplificador” es una molécula, típicamente un polinucleótido, que es capaz de hibridar con múltiples sondas marcadoras. Típicamente, el amplificador hibrida con múltiples sondas marcadoras idénticas. El amplificador puede hibridar también con un ácido nucleico diana, al menos una sonda diana o ácido nucleico unido a una sonda diana, tal como un preamplificador. Por ejemplo, el amplificador puede hibridar con al menos una sonda diana y con una pluralidad de sondas diana, o con un preamplificador y una pluralidad de sondas marcadoras. El amplificador puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico lineal, bifurcado, de tipo peine o ramificado. Como se describe en la presente memoria para todos los polinucleótidos, el amplificador puede incluir nucleótidos modificados y/o ligamientos internucleotídicos no estándares así como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o enlaces fosfodiéster estándares. Se describen amplificadores adecuados, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.635.352, 5.124.246, 5.710.264, 5.849.481 y 7.709.198 y las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688.

Como se usa en la presente memoria, un “preamplificador” es una molécula, típicamente un polinucleótido, que sirve como intermedio entre una o más sondas diana y uno o más amplificadores. Típicamente, el preamplificador hibrida simultáneamente con una o más sondas diana y con una pluralidad de amplificadores. Se describen preamplificadores ejemplares, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.635.352, 5.681.697 y 7.709.198 y las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688.

Como se usa en la presente memoria, un “complejo intermedio” es una molécula, y puede ser una molécula compleja grande o un ensamblaje de múltiples moléculas que tiene uno o más componentes, conteniendo cada uno una sección capaz de unirse específicamente a una sección del ácido nucleico diana y que tiene otro componente o múltiples componentes que contienen cada uno una o múltiples secciones capaces de unirse a la sonda marcadora.

En una realización, puede llevarse a cabo un método de detección de dos o más ácidos nucleicos diana en una muestra tales como de IGKCR, IGLCR o IGLL5, (a) poniendo en contacto una muestra con dos o más sondas marcadoras, en el que cada sonda marcadora comprende un marcaje enzimático o marcaje no enzimático distinto y apunta a una diana de ácido nucleico distinta; (b) enlazando o uniendo las dos o más sondas marcadoras con un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana en la muestra por hibridación; (c) poniendo en

contacto la muestra con un primer sustrato para la primera enzima de la primera sonda marcadora; (d) haciendo reaccionar el primer sustrato con la primera enzima, produciendo así un primer señal detectable asociada a la primera molécula de ácido nucleico diana; (e) poniendo en contacto la muestra con un segundo sustrato para la segunda enzima de la segunda sonda marcadora; (f) haciendo reaccionar el segundo sustrato con la segunda enzima, produciendo así una segunda señal detectable asociada a la segunda molécula de ácido nucleico diana y (g) detectando la primera señal detectable y la segunda señal detectable, detectando así el primer y segundo ácidos nucleicos diana en la muestra.

Se muestran realizaciones ejemplares de configuraciones de sonda en la Figura 9. Con más detalle, la Figura 9A muestra una realización ejemplar donde se muestra la detección de dos dianas de ácido nucleico (NA1 y NA2). Se entiende por los especialistas en la materia que tales dianas de ácido nucleico son distintas entre sí porque son moléculas de ácido nucleico no idénticas que tienen diferentes secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser ARNm de IGKCR, IGLCR o ILL5C. Tales moléculas de ácido nucleico distintas pueden distinguirse entre sí mediante la selección de regiones apropiadas de la diana de ácido nucleico tales que pueda conseguirse una unión específica y distinguible con las dianas de ácido nucleico. Como se describe en la presente memoria, en algunos casos pueden utilizarse etapas adicionales para distinguir dos dianas de ácido nucleico diferentes si hay una superposición y homología sustanciales entre dos dianas (véase el Ejemplo y la relación entre IGLCR e IGLL5). Tal selección de regiones apropiadas y diseño de reactivos específicos y selectivos que se unen a ácidos nucleicos diana, en particular oligonucleótidos o sondas que se unen específica y selectivamente a un ácido nucleico diana, son bien conocidos por los especialistas en la materia (véanse Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)). Puede conseguirse la especificidad deseada usando una selección apropiada de regiones de un ácido nucleico diana así como longitudes apropiadas de un agente de unión tal como un oligonucleótido o sonda, y tales métodos de selección son bien conocidos por los especialistas en la materia. Por tanto, un especialista en la materia entenderá fácilmente y puede determinar fácilmente los reactivos apropiados, tales como oligonucleótidos o sondas, que pueden usarse para apuntar a un ácido nucleico diana particular frente a otro ácido nucleico diana.

Como se representa en la Figura 9A, puede ponerse en contacto una muestra que contiene distintos ácidos nucleicos diana (NA1 y NA2) con dos sondas marcadoras. Cada una de las sondas marcada es específica de un ácido nucleico diana. La realización representada en la Figura 9A muestra la sonda marcadora que se une al ácido nucleico diana mediante un complejo intermedio (discutido a continuación). Sin embargo, un especialista en la materia puede prever fácilmente usar una sonda marcadora que se una directamente al ácido nucleico diana, si se desea. La especificidad de una sonda diana por un ácido nucleico diana se consigue mediante (1) selección de una región de unión a diana de ácido nucleico adecuada que sea un oligonucleótido complementario del ácido nucleico diana y (2) acoplamiento de la región de unión que comprende el oligonucleótido con una enzima específica. Como alternativa, pueden usarse otros tipos de marcajes, como se divulga en la presente memoria, por ejemplo un marcaje fluorescente o cromogénico que usa cromóforos o fluoróforos. Por consiguiente, la descripción siguiente que describe el uso de enzimas como marcaje puede llevarse a cabo de forma similar usando otros marcajes detectables, como se divulga en la presente memoria. La sonda marcadora proporciona así la asociación de un agente detectable, en este caso una enzima, con una diana de ácido nucleico particular. En el caso de un marcaje enzimático, se utiliza la actividad enzimática de la enzima para generar una señal detectable. Como se muestra en la Figura 9A, la sonda marcadora que apunta a una primera diana de ácido nucleico es distinta de la sonda marcadora que apunta a una segunda diana de ácido nucleico. La sonda marcadora de la primera diana de ácido nucleico (LP1) comprende una región de unión, es decir, un oligonucleótido que es complementario de, y puede hibridar específica y selectivamente con, el ácido nucleico 1, y un primer marcaje específico tal como una enzima, mientras que la segunda sonda marcadora (LP2) comprende una región de unión, es decir, un oligonucleótido que es complementario de, y puede hibridar específica y selectivamente con, el ácido nucleico 2 y un segundo marcaje específico tal como una enzima, donde el primer y segundo marcajes específicos, por ejemplo marcajes enzimáticos o no enzimáticos, son distintos entre sí. Las enzimas específicas y distintas ejemplares pueden seleccionarse de peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa y glucosa oxidasa y similares, como se divulga en la presente memoria. Por tanto, la sonda marcadora se diseña de tal modo que pueda apuntar específica y selectivamente a un ácido nucleico diana particular y asociar un marcaje distinguible con el ácido nucleico diana utilizando distintos marcajes tale como marcajes enzimáticos o no enzimáticos en sondas marcadoras para diferentes ácidos nucleicos diana.

Como se describe en la presente memoria, los métodos de la invención utilizan distintos marcajes enzimáticos o no enzimáticos que permiten la asociación de un marcaje detectable distinguible a un ácido nucleico diana. Puede utilizarse cualquiera de una serie de marcajes enzimáticos o no enzimáticos a condición de que pueda detectarse la actividad enzimática o el marcaje no enzimático, respectivamente. La enzima produce así una señal detectable, que puede utilizarse para detectar un ácido nucleico diana. Son señales detectables particularmente útiles las señales cromogénicas o fluorogénicas. Por consiguiente, las enzimas particularmente útiles para uso como marcaje incluyen aquellas para las que está disponible un sustrato cromogénico o fluorogénico. Tales sustratos cromogénicos o fluorogénicos pueden convertirse mediante reacción enzimática en un producto cromogénico o fluorescente fácilmente detectable, que puede detectarse y/o cuantificarse fácilmente usando microscopía o espectroscopía. Tales enzimas son bien conocidas por los especialistas en la materia incluyendo, pero sin limitación, peroxidasa de

rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucosa oxidasa y similares (véase Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996)). Otras enzimas que tienen sustratos cromogénicos o fluorogénicos bien conocidos incluyen diversas peptidasas donde los sustratos peptídicos cromogénicos o fluorogénicos pueden utilizarse para detectar reacciones de escisión proteolítica. El uso de sustratos cromogénicos y fluorogénicos es

también bien conocido en el diagnóstico bacteriano incluyendo, pero sin limitación, el uso de  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, 6-fosfo- $\beta$ -D-galátosido 6-fosfogalactohidrolasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa, amilasa, neuraminidasa, esterasas, lipasas y similares (Manafi *et al.*, *Microbiol. Rev.* 55: 335-348 (1991)), y tales enzimas con sustratos cromogénicos o fluorogénicos conocidos pueden adaptarse fácilmente para uso en los métodos de la presente invención.

Son bien conocidos por los especialistas en la materia diversos sustratos cromogénicos o fluorogénicos para producir señales detectables y están comercialmente disponibles. Los sustratos ejemplares que pueden utilizarse para producir una señal detectable incluyen, pero sin limitación, 3,3'-diaminobenzidina (DAB), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), cloronaftol (4-CN) (4-cloro-1-naftol), ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) y 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) para peroxidasa de rábano picante; 1-fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP), nitroazul de tetrazolio (NBT), Fast Red (Fast Red TR/AS-MX) y fosfato de p-nitrofenilo (PNPP) para fosfatasa alcalina;  $\beta$ -D-galactopiranosido de 1-metil-3-indolilo y  $\beta$ -D-galactopiranosido de 2-metoxi-4-(2-nitrovinil)fenilo para  $\beta$ -galactosidasa; 2-metoxi-4-(2-nitrovinil)fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido para  $\beta$ -glucosidasa y similares. Los sustratos fluorogénicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, fosfato de 4-(trifluorometil)umbeliferilo para fosfatasa alcalina; bis-(2-amino-2-metil-1,3-propanodiol)fosfato de 4-metilumbeliferilo, bis(ciclohexilamonio)fosfato de 4-metilumbeliferilo y fosfato de 4-metilumbeliferilo para fosfatasas; QuantaBlu™ y QuantaRed™ para peroxidasa de rábano picante;  $\beta$ -D-galactopiranosido de 4-metilumbeliferilo, di( $\beta$ -D-galactopiranosido) de fluoresceína y di( $\beta$ -D-galactopiranosido) de naftofluoresceína para  $\beta$ -galactosidasa;  $\beta$ -D-glucopiranosido de 3-acetilumbeliferilo y  $\beta$ -D-glucopiranosido de 4-metilumbeliferilo para  $\beta$ -glucosidasa; y  $\alpha$ -D-galactopiranosido de 4-metilumbeliferilo para  $\alpha$ -galactosidasa. Se describen también enzimas y sustratos ejemplares para producir una señal detectable, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. 2012/0100540. Son bien conocidos diversos sustratos enzimáticos detectables, incluyendo sustratos cromogénicos o fluorogénicos, y están comercialmente disponibles (Pierce, Rockford IL; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX; Invitrogen, Carlsbad CA; 42 Life Science; Biocare). Generalmente los sustratos se convierten en productos que forman precipitados que se depositan en el sitio del ácido nucleico diana. Otros sustratos ejemplares incluyen, pero sin limitación, HRP-Green (42 Life Science), Betazoid DAB, Cardassian DAB, Romulin AEC, Bajoran Purple, Vina Green, Deep Space Black™, Warp Red™, Vulcan Fast Red y Ferangi Blue de Biocare (Concord CA; biocare.net/products/detection/chromogens).

La biotina-avidina (o biotina-estreptavidina) es un sistema de amplificación de señal bien conocido basado en los hechos de que las dos moléculas tienen una afinidad extraordinariamente alta entre sí y de que una molécula de avidina/estreptavidina puede unirse a cuatro moléculas de biotina. Los anticuerpos se usan ampliamente para amplificación de señal en inmunohistoquímica e ISH. La amplificación de señal de tiramida (TSA) está basada en la deposición de un gran número de moléculas de tiramida haptenizadas por actividad peroxidasa. La tiramina es un compuesto fenólico. En presencia de pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno, la peroxidasa de rábano picante (HRP) inmovilizada convierte el sustrato marcado en un intermedio extremadamente reactivo de corta vida. Las moléculas de sustrato activadas pueden reaccionar entonces muy rápidamente y unirse covalentemente con restos de proteínas ricos en electrones, tales como tirosina, en o cerca del sitio de unión de peroxidasa. De este modo, pueden introducirse muchas moléculas extra de hapteno conjugadas con tiramida en el sitio de hibridación *in situ*. Posteriormente, las moléculas de tiramida-hapteno depositadas pueden visualizarse directa o indirectamente. Se describe tal sistema de detección con más detalle en la publicación de EE.UU. 2012/0100540.

Las realizaciones descritas en la presente memoria pueden utilizar enzimas para generar una señal detectable usando sustratos cromogénicos o fluorogénicos apropiados. Se entiende que, como alternativa, una sonda marcadora puede tener un marcaje detectable acoplado directamente con la porción de ácido nucleico de la sonda marcadora. Son bien conocidos por los especialistas en la materia marcajes detectables ejemplares, incluyendo pero sin limitación marcajes cromogénicos o fluorescentes (véase Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996)). Los fluoróforos ejemplares útiles como marcajes incluyen, pero sin limitación, derivados de rodamina, por ejemplo tetrametilrodamina, rodamina B, rodamina 6G, sulforrodamina B, Texas Red (sulforrodamina 101), rodamina 110 y derivados de los mismos tales como tetrametilrodamina 5 (o 6), lisamina rodamina B y similares; 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD); fluoresceína y derivados de la misma; naftalenos tales como dansilo (5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonilo); derivados de cumarina tales como ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), 7-dietilamino-3-[(4'-(yodoacetil)amino)fenil]-4-metilcumarina (DCIA), tintes fluorados Alexa (Molecular Probes) y similares; 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY™) y derivados del mismo (Molecular Probes; Eugene Oreg.); pirenos y pirenos sulfonados tales como Cascade Blue™ y derivados del mismo, incluyendo ácido 8-metoxipireno-1,3,6-trisulfónico y similares; derivados de piridiloxazol y derivados de dapoxilo (Molecular Probes); amarillo Lucifer (3,6-disulfonato-4-aminonaftalimida) y derivados del mismo; tintes fluorescentes CyDye™ (Amersham/GE Healthcare Life Sciences; Piscataway NJ) y similares. Los cromóforos ejemplares incluyen, pero sin limitación, fenolftaleína, verde de malaquita, nitroaromáticos tales como nitrofenilo, tintes diazoicos, dabsilo (4-dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonilo) y similares.

En una realización, las sondas marcadoras hibridan directamente con las moléculas de ácido nucleico diana. Como se discute anteriormente, en tal realización la sonda marcadora misma comprende una región de unión a diana de ácido nucleico, tal como un oligonucleótido complementario, y se une directamente al ácido nucleico diana. Como alternativa, la sonda marcadora puede unirse al ácido nucleico diana indirectamente usando un complejo intermedio. Tal realización se representa en la Figura 9A. En una de tales realizaciones, el complejo intermedio puede ser una única molécula tal como una única molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, un complejo intermedio que es una única molécula puede comprender una región que es capaz de enlazarse o unirse específica y selectivamente con un ácido nucleico diana. Esto es similar a una sonda marcadora que se diseña para enlazarse o unirse con un ácido nucleico diana, excepto porque la unión a la diana de ácido nucleico está mediada por la molécula intermedia. La molécula intermedia puede comprender también una región que es capaz de unirse específica y selectivamente con una sonda marcadora (véase la Figura 9A). En tal caso, la sonda marcadora y la molécula intermedia se diseñan para tener regiones de unión tales como regiones oligonucleotídicas que sean complementarias entre sí. Tal configuración asocia así el marcaje enzimático a un ácido nucleico diana específica y selectivamente a través de una molécula intermedia. Como se representa adicionalmente en la Figura 9A, puede asociarse específica y selectivamente un segundo ácido nucleico diana a un marcaje enzimático o no enzimático distinto a través de un segundo complejo intermedio. El segundo complejo intermedio comprende una primera región que puede unirse específica y selectivamente con el ácido nucleico diana y una segunda región que puede unirse específica y selectivamente con la segunda sonda marcadora. Por tanto, las sondas marcadoras pueden unirse a las moléculas de ácido nucleico diana mediante un primer y un segundo complejos intermedios (véase la Figura 9A). Además, el complejo intermedio puede comprender una molécula que comprende una primera región complementaria del ácido nucleico diana y la misma o una molécula diferente que comprende al menos una segunda región complementaria de la sonda marcadora. Es más, el complejo intermedio puede comprender un ensamblaje de múltiples moléculas, de las cuales uno o más componentes comprende cada uno una o más regiones complementarias del ácido nucleico diana y uno o más de otros componentes que comprenden cada uno una o más regiones complementarias de la sonda marcadora. De este modo, el complejo intermedio puede ser una estructura amplificadora que permita enlazar múltiples sondas marcadoras con una región de un ácido nucleico diana. En general, el complejo intermedio comprende una o más moléculas de ácido nucleico para aprovechar las capacidades de unión específica y selectiva de las interacciones de ácido nucleico, como se describe en la presente memoria.

Como se describe en la presente memoria, puede ponerse en contacto una muestra con dos o más sondas marcadoras, donde cada sonda marcadora comprende un marcaje enzimático o no enzimático distinto y apunta a una diana de ácido nucleico distinta. Las sondas marcadoras se unen a las moléculas de ácido nucleico diana mediante hibridación de regiones complementarias en el ácido nucleico diana y en la sonda marcadora o el complejo intermedio, como se discute anteriormente. En particular, se ponen en contacto las dos o más sondas marcadoras con la muestra simultáneamente, de modo que las sondas marcadoras se unan a los ácidos nucleicos diana respectivos en la misma reacción. Esto es particularmente útil porque la asociación del marcaje a cada uno de los ácidos nucleicos diana puede ocurrir al mismo tiempo, reduciendo así el tiempo de ensayo y los costes de reactivos. Esto contrasta con otros métodos, donde las reacciones de hibridación para cada ácido nucleico diana se llevan a cabo secuencialmente. No obstante, se entiende que los métodos de la invención puedan preformarse con etapas de hibridación secuenciales, si se desea.

Como se describe en la presente memoria, la sonda marcadora usada en los métodos de la invención puede comprender una región de unión a ácido nucleico diana que comprende un oligonucleótido que es complementaria del ácido nucleico diana o complementaria de un componente de un complejo intermedio que se une al ácido nucleico diana. En tal configuración de una sonda marcadora, se acopla la porción oligonucleotídica con un marcaje enzimático o no enzimático. Esto difiere de métodos anteriores, donde se usa una enzima para detectar una diana de ácido nucleico a través de un anticuerpo, donde el anticuerpo se detecta usando métodos de inmunodetección bien conocidos. La configuración de sonda marcadora usada en los métodos de la presente invención es particularmente útil debido a que el marcaje enzimático o marcaje no enzimático está acoplado con un oligonucleótido que se une específica y selectivamente con un ácido nucleico diana. El acoplamiento del marcaje enzimático o no enzimático con el oligonucleótido en la sonda marcadora puede ser covalente, usando métodos de acoplamiento químico bien conocidos (véase, por ejemplo, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996)). Como alternativa, puede usarse una interacción de alta afinidad tal como biotina/avidina, donde se acopla biotina o avidina con el oligonucleótido y el marcaje enzimático o no enzimático en la sonda marcadora, para acoplar el marcaje enzimático o marcaje no enzimático con el oligonucleótido en la sonda marcadora (véase la publicación de EE.UU. 2012/0100540). Se entiende que el acoplamiento del marcaje enzimático o no enzimático con el oligonucleótido en la sonda marcadora es de suficiente afinidad, tal como mediante una interacción tal como biotina/avidina, o es covalente de tal modo que el marcaje enzimático o no enzimático permanezca enlazado con el oligonucleótido a lo largo de diversas reacciones y condiciones de ensayo de los métodos de la invención.

Una vez se unen las sondas marcadoras con los ácidos nucleicos diana, directamente o mediante un complejo intermedio, se pone en contacto la muestra con un primer sustrato de la primera enzima de la primera sonda marcadora cuando se usa una enzima como marcaje. Se representa tal reacción en la Figura 9A. Al usar una primera enzima distinta y un sustrato apropiado, puede generarse una señal detectable que está asociada al ácido nucleico diana y es por lo tanto distinta para el primer ácido nucleico diana. Como alternativa, puede usarse un marcaje detectable distinto que no sea una enzima y no requiera el uso de un sustrato enzimático para generar

señal detectable. Puesto que las condiciones de reacción para una enzima distinta son a menudo diferentes y utilizan un sustrato diferente, pueden llevarse a cabo los métodos de la invención de tal modo que se añada secuencialmente un segundo sustrato para la segunda enzima distinta, después de tener lugar la reacción con la primera enzima. Opcionalmente, la primera enzima puede inactivarse previamente a la adición secuencial del segundo sustrato de la segunda enzima distinta. Se entiende que, si las enzimas distintas son compatibles, pueden llevarse a cabo la primera y segunda reacciones enzimáticas coincidentemente. En una realización particular, se lleva a cabo la primera reacción enzimática y se genera la señal detectable, seguido secuencialmente de la segunda reacción enzimática y la producción de la segunda señal detectable (véase la Figura 9A). Las etapas secuenciales pueden llevarse a cabo opcionalmente con una etapa de lavado intermedia, en particular si la reacción de la segunda enzima no es compatible con las condiciones de reacción de la primera enzima.

Como se describe en la presente memoria, se asocian distintos marcajes enzimáticos o no enzimáticos a un ácido nucleico diana usando sondas marcadoras que apuntan a dianas de ácido nucleico distintas. La asociación de una enzima distinta a un ácido nucleico diana permite el uso de la actividad enzimática de la enzima para generar una señal detectable asociada a un ácido nucleico diana. En particular, puede usarse un sustrato cromogénico o fluorogénico para producir una señal cromogénica o fluorescente detectable asociada a un ácido nucleico diana. Puesto que las distintas enzimas están asociadas a distintos ácidos nucleicos diana, las señales detectables están asociadas a los ácidos nucleicos diana respectivos, permitiendo así la detección de los ácidos nucleicos diana. Como alternativa, pueden usarse distintos marcajes no enzimáticos para marcar distintamente los dos o más ácidos nucleicos diana. Como se describe en la presente memoria, pueden utilizarse métodos bien conocidos tales como microscopía o espectroscopía para visualizar las señales cromogénicas o fluorescentes detectables asociadas a los ácidos nucleicos diana respectivos. En general, se utilizarán sustratos cromogénicos o sustratos fluorogénicos, o marcajes cromogénicos o fluorescentes, para un ensayo particular de modo que pueda usarse un solo tipo de instrumento para la detección de dianas de ácido nucleico en la misma muestra.

En otra realización, puede practicarse un método de detección de dos o más ácidos nucleicos diana (a) poniendo en contacto una muestra con dos o más conjuntos de sondas marcadoras, en el que cada conjunto de sondas marcadoras comprende una pluralidad de sondas marcadoras, en el que la pluralidad de sondas marcadoras en un conjunto tiene el mismo marcaje enzimático o marcaje no enzimático, y opcionalmente en el que la pluralidad de sondas marcadoras comprende sondas marcadoras que se unen a diferentes regiones de una molécula de ácido nucleico diana; y en el que cada conjunto de sondas marcadoras comprende un marcaje enzimático o no enzimático distinto y apunta a una diana de ácido nucleico distinta; (b) enlazando o uniendo los dos o más conjuntos de sondas marcadoras con un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana en la muestra por hibridación; (c) poniendo en contacto la muestra con un primer sustrato de la primera enzima del primer conjunto de sondas marcadoras si se usa un marcaje enzimático; (d) haciendo reaccionar el primer sustrato con la primera enzima, produciendo así una primera señal detectable asociada a la primera molécula de ácido nucleico diana; (e) poniendo en contacto la muestra con un segundo sustrato de la segunda enzima del segundo conjunto de sondas marcadoras si se usa un marcaje enzimático; (f) haciendo reaccionar el segundo sustrato con la segunda enzima, produciendo así una segunda señal detectable asociada a la segunda molécula de ácido nucleico diana y (g) detectando la primera señal detectable y la segunda señal detectable, detectando así el primer y segundo ácidos nucleicos diana en la muestra.

Los métodos pueden incluir la etapa de poner en contacto una muestra con dos o más conjuntos de sondas marcadoras, en los que cada conjunto de sondas marcadoras comprende una pluralidad de sondas marcadoras, en los que la pluralidad de sondas marcadoras en un conjunto tiene el mismo marcaje enzimático o no enzimático, y opcionalmente en los que la pluralidad de sondas enzimáticas comprende sondas enzimáticas que se enlazan o unen con regiones diferentes de una molécula de ácido nucleico diana; y en los que cada conjunto de sondas marcadoras comprende un marcaje enzimático o no enzimático distinto y apunta a una diana de ácido nucleico distinta; enlazar o unir los dos o más conjuntos de sondas marcadoras con dos o más ácidos nucleicos diana, por ejemplo al menos un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, o ácidos nucleicos diana adicionales, en la muestra por hibridación; poner en contacto la muestra con un primer sustrato de la primera enzima del primer conjunto de sondas marcadoras si el marcaje es una enzima; hacer reaccionar el primer sustrato con la primera enzima, produciendo así una primera señal detectable asociada a la primera molécula de ácido nucleico diana; poner en contacto la muestra con un segundo sustrato de la segunda enzima del segundo conjunto de sondas marcadoras si el marcaje es una enzima; hacer reaccionar el segundo sustrato con la segunda enzima, produciendo así una segunda señal detectable asociada a la segunda molécula de ácido nucleico diana; y detectar la primera señal detectable y la segunda señal detectable, detectando así el primer y segundo ácidos nucleicos diana en la muestra. Como alternativa, pueden usarse distintos marcajes detectables acoplados directamente con la sonda marcadora.

Se representa en la Figura 9B una realización de la invención que utiliza conjuntos de sondas. Como se muestra en la Figura 9B, se emplea un conjunto de sondas marcadoras donde las sondas marcadoras en el conjunto apuntan a diferentes regiones del ácido nucleico diana. Un especialista en la materia comprenderá fácilmente que, aunque la realización representada en la Figura 9B muestra la unión de una sonda marcadora con un ácido nucleico a través de un complejo intermedio, puede usarse una configuración donde la sonda marcadora se una directamente con el ácido nucleico diana. En general, un conjunto de sondas marcadoras de un ácido nucleico diana hibridará con

regiones no superpuestas del ácido nucleico diana. Esto permite a cada una de las sondas marcadoras en el conjunto unirse independientemente entre sí y no competitivamente, maximizando así la señal. Aunque las sondas marcadoras en el conjunto se unen a diferentes regiones del ácido nucleico diana, se acopla el mismo marcaje enzimático distinto, o marcaje no enzimático distinto, con cada una de las sondas marcadoras en el conjunto. Por tanto, en lugar de tener una única región del ácido nucleico diana que se une a la sonda marcadora, como se representa en la Figura 9A, se unen múltiples sondas marcadoras con el ácido nucleico diana. Puesto que se acopla el mismo marcaje enzimático distinto, o marcaje no enzimático distinto, con cada una de las sondas marcadoras en el conjunto, se unen múltiples copias de la enzima con el ácido nucleico diana. Esta configuración puede usarse por lo tanto para aumentar sustancialmente la señal detectable asociada al ácido nucleico diana.

Como se describe anteriormente, las sondas marcadoras en un conjunto de sondas marcadoras pueden hibridar directamente con las moléculas de ácido nucleico diana. Como alternativa, las sondas marcadoras pueden unirse con las moléculas de ácido nucleico diana mediante un primer y segundo complejos intermedios (véase la Figura 9B). Como se describe en la presente memoria, el complejo intermedio puede comprender una molécula que comprende una primera región complementaria del ácido nucleico diana y la misma u otra molécula que comprende al menos una segunda región complementaria de la sonda marcadora (véase la Figura 9B). Como se representa en la Figura 9B, usar conjuntos de sondas marcadoras proporciona una señal detectable aumentada para asociar a los ácidos nucleicos diana respectivos.

En aún otra realización, los métodos de la invención pueden emplear un complejo intermedio, donde el complejo intermedio comprende múltiples moléculas en lugar de una única molécula. Tal complejo intermedio es particularmente útil para amplificar la señal detectable, proporcionando una detección de mayor sensibilidad de los ácidos nucleicos diana. Tales métodos de amplificación de señal se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.635.352, 5.124.246, 5.710.264, 5.849.481 y 7.709.198 y las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688, así como los documentos WO 2007/001986 y WO 2012/054795.

En una realización que utiliza un complejo intermedio, el complejo intermedio puede comprender un amplificador o preamplificador. Tal realización se representa en la Figura 9C. En particular, la Figura 9C muestra un complejo intermedio donde se usa un amplificador. Con el uso de un amplificador, que comprende por sí mismo una región de unión a ácido nucleico diana, pueden enlazarse múltiples copias de la sonda marcadora con el ácido nucleico diana con un único amplificador. Aunque se representa en la Figura 9C como dos sondas marcadoras que se unen al amplificador, se entiende que esto es meramente ejemplar y que pueden unirse con el amplificador múltiples copias de la sonda marcadora, como se desee. Por tanto, pueden hibridarse una pluralidad de sondas marcadoras con uno o más amplificadores. De forma similar a la realización mostrada en la Figura 9B, pueden usarse múltiples amplificadores que se unen a diferentes regiones del ácido nucleico diana, proporcionando así una amplificación de señal incluso mayor, uniéndose cada amplificador con múltiples copias de la sonda marcadora. Como con otras realizaciones descritas en la presente memoria, las sondas marcadoras para apuntar a una diana de ácido nucleico particular están acopladas con el mismo marcaje enzimático o no enzimático distinto. Se entiende que, aunque la Figura 9C representa el uso de un preamplificador, puede usarse una configuración de sonda donde se diseña un amplificador para unirse directamente a un ácido nucleico diana sin el uso de un preamplificador.

En otra realización representada en la Figura 9C, el complejo intermedio puede comprender un amplificador y un preamplificador. En esta configuración, el preamplificador comprende una región de unión a ácido nucleico y múltiples sitios de unión para amplificadores. Por tanto, puede hibridar una pluralidad de amplificadores con un preamplificador. De nuevo, los amplificadores pueden contener múltiples sitios de unión de la sonda marcadora, y las sondas marcadoras usadas para una diana de ácido nucleico particular comprenden el mismo marcaje enzimático o no enzimático, de modo que el mismo marcaje enzimático distinto, o marcaje no enzimático no distinto, esté asociado al ácido nucleico diana. En una configuración que usa un preamplificador, el preamplificador hibrida con el ácido nucleico diana. Aunque representado en la Figura 9C con una sonda marcadora, como se describe a continuación, se entiende que un preamplificador puede diseñarse de modo que se una directamente al ácido nucleico diana, si se desea.

En aún otra realización, el complejo intermedio puede comprender una sonda diana, amplificador y preamplificador. Se representa tal realización en la Figura 9C. De forma similar a la realización descrita anteriormente, se usa un preamplificador con múltiples amplificadores unidos, y se unen múltiples sondas marcadoras con los amplificadores. Sin embargo, en lugar de unirse directamente el preamplificador con la diana de ácido nucleico, se usa una sonda marcadora. Al usar una sonda marcadora, no se requiere que el preamplificador tenga una región de unión diana de ácido nucleico. En lugar de ello, se diseña la sonda diana para comprender una región de unión de la diana de ácido nucleico. Si se usa más de una sonda diana, pueden diseñarse múltiples sondas diana para unirse a diferentes regiones del ácido nucleico diana, como se muestra en la Figura 9C. En tal configuración, puede usarse el mismo preamplificador para múltiple eventos de unión a través de la sonda marcadora en lugar de diseñar y generar diferentes preamplificadores para apuntar a diferentes regiones del ácido nucleico diana. Aunque representada en la Figura 9C como configuración "Z", se entiende que puede usarse cualquier configuración adecuada a condición de que la sonda diana comprenda regiones complementarias de un ácido nucleico diana y un preamplificador. Además, se entiende que puede usarse una única sonda diana para unirse al preamplificador en lugar de dos sondas marcadoras por cada amplificador como se representa en la Figura 9C.

Por tanto, en una realización particular, el complejo intermedio puede comprender sonda diana, amplificador y preamplificador (véase la Figura 9C). Además, puede hibridar una pluralidad de sondas marcadoras con uno o más amplificadores, puede hibridar una pluralidad de amplificadores con un preamplificador y puede hibridar el preamplificador con una sonda diana.

En todavía otra realización, puede usarse una configuración similar a la representada en la Figura 9C, donde el complejo intermedio comprende sonda diana, preamplificador y amplificador. En lugar de usar una única sonda diana para unir el preamplificador con el ácido nucleico diana, se usan dos o más sondas marcadoras para unir el preamplificador con el ácido nucleico diana (véase la Figura 9C). En general, pueden comprenderse las ventajas de tal configuración usando dos sondas diana, es decir, un par de sondas diana para unir un preamplificador con el ácido nucleico diana. Se describen tal configuración y sus ventajas para aumentar la sensibilidad y disminuir el fondo, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7.709.198, las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688, y los documentos WO 2007/001986 y WO 2007/002006. La patente de EE.UU. nº 7.709.198 y las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688 describen adicionalmente detalles para seleccionar características de las sondas diana, incluyendo pares de sondas diana, incluyendo longitud, orientación, condiciones de hibridación y similares, como se discute a continuación con más detalle.

Como se divulga en la presente memoria, aunque las figuras representan generalmente la detección de uno o dos ácidos nucleicos diana, se entiende que tales métodos pueden aplicarse fácilmente a un ácido nucleico diana o a la detección multiplexada de dos o más dianas de ácido nucleico, por ejemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso números mayores de dianas de ácido nucleico distintas. Por ejemplo, puede practicarse un ensayo para detectar ARNm de IGKCR, IGLCR y/o IGLL5 en métodos de la invención. Todo lo que se requiere es la disponibilidad de un número adecuado de marcajes enzimáticos o no enzimáticos distintos para uso como marcaje distinto para cada uno de los ácidos nucleicos diana. Por tanto, los métodos de la invención pueden aplicarse para detectar múltiples dianas de ácido nucleico, en particular dos o más dianas de ácido nucleico, en una muestra.

Se entiende por los especialistas en la materia que puede usarse cualquiera de una serie de muestras adecuadas para detectar ácidos nucleicos diana usando los métodos de la invención. La muestra para uso en los métodos de la invención será generalmente una muestra biológica o muestra de tejido. Tal muestra puede obtenerse de un sujeto biológico, incluyendo una muestra de tejido biológico o de origen de fluido que se recoge de un individuo o alguna otra fuente de material biológico tal como una biopsia. Una muestra biológica incluye también muestras de una región de un sujeto biológico que contiene o se sospecha que contiene células o tejidos cancerosos o precancerosos, por ejemplo un tejido de biopsia, muestra de médula ósea o muestra de sangre. Tales muestras pueden ser, pero sin limitación, órganos, tejidos, fracciones de tejido y/o células aisladas de un organismo tal como un mamífero, en particular un ser humano. Para análisis de linfocitos B, pueden emplearse muestras de sangre, médula ósea o tejido apropiadas que contienen un número adecuado de linfocitos B para análisis. Tales muestras incluyen, pero sin limitación, una sección de tejido o sección de coágulo de médula ósea. En una realización particular, la sección de tejido o sección de médula ósea está fijada con formalina y embebida en parafina (FFPE).

La muestra o espécimen biológico puede procesarse mediante cualquiera de una serie de métodos rutinarios usados para manejar muestras biológicas. Por ejemplo, las células pueden usarse aisladas o procesadas, por ejemplo como secciones de tejido u otros especímenes de tejido, incluyendo células fijadas tales como tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE), tejido congelado reciente, glóbulos blancos y similares. Los métodos para procesar muestras de tejido o celulares para hibridación *in situ* son bien conocidos para los especialistas en la materia (véanse, por ejemplo, Stoler, *Clinics in Laboratory Medicine* 10(1): 215-236 (1990); *In situ hybridization. A practical approach*, Wilkinson, ed., IRL Press, Oxford (1992); Schwarzscher y Heslop-Harrison, *Practical in situ hybridization*, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford (2000)). Son bien conocidos métodos para procesar muestras para el análisis de posibles neoplasias de linfocito B en el campo del diagnóstico clínico y la hematopatología (véanse Knowles, *Neoplastic Hematopathology*, 2ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia PA (2001); Lehmen *et al.*, *Am. J. Pathol.* 159: 2023-2029 (2001); Arber, *J. Mol. Diagnostics* 2: 178-190 (2000); Plank *et al.*, *Am. J. Clin. Pathol.* 103: 330-337 (1995)).

Como se divulga en la presente memoria, los métodos de la invención proporcionan un método de ensayo conveniente para detectar múltiples ácidos nucleicos diana en la misma muestra. Además del acoplamiento directo de una sonda marcadora con un marcaje enzimático o no enzimático, en otra realización puede usarse un anticuerpo como intermedio para marcar el ácido nucleico diana. Se han descrito anteriormente métodos para detectar dos ADN diana simultáneamente, tales como un ensayo cromogénico ISH (CISH) de dos colores (documento US 2011/033176), en que se conjugan sondas contra dos genes diferentes con un hapteno tal como digoxigenina (DIG) o dinitrofenilo (DNP). Se usan entonces anticuerpos anti-DIG y anti-DNP, u otros anticuerpos antihapteno adecuados que están conjugados con enzimas diferentes, tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina, para generar precipitados de diferente color. Aunque el ensayo permite la visualización de las dos dianas, la visualización ocurre usando un anticuerpo para dirigir la enzima al ácido nucleico diana.

Como se divulga en la presente memoria, utilizando una sonda marcadora que comprende ácido nucleico para unirse al ácido nucleico diana, puede conseguirse un alto nivel de especificidad y selectividad usando un diseño oligonucleotídico informatizado apropiado y seleccionando y controlando las condiciones de hibridación usando métodos bien conocidos. Puede optimizarse la selectividad y especificidad de tal sistema y minimizarse la unión no

específica entre dianas de ácido nucleico. Además, los métodos de la invención proporcionan un sistema mediante el cual un marcaje enzimático o no enzimático distinto apunta a un ácido nucleico mediante hibridación de ácido nucleico, donde el marcaje enzimático o no enzimático está directamente acoplado con una porción de ácido nucleico de la sonda marcadora. Aunque los métodos de la invención pueden utilizar un anticuerpo como intermedio para apuntar una enzima a un ácido nucleico, en una realización particular, los métodos usan una sonda marcadora que comprende una porción de ácido nucleico que se une a una secuencia de ácido nucleico complementaria y un marcaje enzimático o no enzimático, donde se usa el acoplamiento directo del marcaje enzimático o no enzimático con la porción de ácido nucleico de la sonda marcadora.

La invención proporciona adicionalmente kits que comprenden componentes para practicar los métodos de la invención. En una realización, la invención proporciona un kit para detectar restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y clonalidad en linfocitos B humanos. El kit puede contener agentes que realizan un ensayo de hibridación *in situ* de ARN, incluyendo al menos un conjunto de sondas que se diseñan para hibridar con ARN de polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina (IGLL5) y un sistema de amplificación de señal. Generalmente, se proporcionaría tal kit en un envase adecuado. Según la invención, el kit comprende además al menos un conjunto de sondas que se diseñan para hibridar con ARN de la región constante de cadena kappa de inmunoglobulina (IGKCR); y al menos un conjunto de sondas que se diseñan para hibridar con ARN de la región constante de cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR). Opcionalmente, el kit puede comprender además al menos un conjunto de sondas de control negativo. En una realización particular, el kit contiene reactivos para practicar un ensayo de hibridación *in situ* como el ensayo RNAscope®.

Tal kit, además de los componentes descritos anteriormente, puede incluir opcionalmente, por ejemplo, sondas marcadoras, amplificadores, sondas diana y similares. Tales componentes pueden diseñarse como para cualquiera de las configuraciones divulgadas en la presente memoria. Un kit de la invención puede comprender, por ejemplo, sondas marcadoras que comprenden distintas enzimas y sustratos cromogénicos o fluorogénicos adecuados para las respectivas enzimas, o marcajes no enzimáticos distintivos, para llevar a cabo los métodos de la invención. Los kits pueden contener componentes no específicos de diana, que pueden usarse para la detección de cualquier ácido nucleico diana deseado, diseñando un componente de unión específica a diana separadamente por el usuario del kit, por ejemplo sondas de ARNm de IGKCR, IGLCR y/o IGLL5. Como alternativa, el kit puede diseñarse para contener componentes que incluyen agentes de unión para uno o más ácidos nucleicos diana particulares, tales como ARNm de IGKCR, IGLCR y/o IGLL5. El kit puede incluir adicionalmente instrucciones para usar los componentes del kit para llevar a cabo los métodos de la invención.

Como se describe en la presente memoria, las realizaciones de la invención pueden incluir el uso de sondas diana. Se describen tal configuración y sus ventajas para aumentar la sensibilidad y disminuir el fondo, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.709.198, las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688, y los documentos WO 2007/001986 y WO 2007/002006. La patente de EE.UU. n° 7.709.198 y las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688 describen adicionalmente detalles para seleccionar características de las sondas diana, incluyendo pares de sondas diana, incluyendo longitud, orientación, condiciones de hibridación y similares. Un especialista en la materia puede identificar fácilmente configuraciones adecuadas basadas en las enseñanzas de las publicaciones de EE.UU. 7.709.198, publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688, y documentos WO 2007/001986 y WO 2007/002006. En la descripción proporcionada a continuación, basada en la divulgación de la presente memoria y las enseñanzas en el documento 7.709.198, las publicaciones de EE.UU. 2008/0038725 y 2009/0081688, y los documentos WO 2007/001986 y WO 2007/002006, un especialista en la materia entenderá que el término “extensor de marcaje”, como se usa en estas referencias y como se discute a continuación, puede usarse intercambiabilmente con el término “sonda diana” como se describe en la presente memoria y se ilustra en las figuras.

Brevemente, una primera clase general de realizaciones incluye métodos de detección de dos o más ácidos nucleicos de interés. En los métodos, se proporcionan una muestra que comprende o se sospecha que comprende los ácidos nucleicos de interés, dos o más subconjuntos de m extensores de marcaje, en los que m es al menos 2, y un sistema de sonda marcadora. Cada subconjunto de m extensores de marcaje es capaz de hibridar con uno de los ácidos nucleicos de interés. Según la invención, el ácido nucleico de interés puede ser de IGKCR, IGLCR e IGLL5. El sistema de sonda marcadora comprende un marcaje, y un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje en un subconjunto. Cada ácido nucleico de interés hibrida con su correspondiente subconjunto de m extensores de marcaje, y el sistema de sonda marcadora hibrida con los m extensores de marcaje. Se detecta entonces la presencia o ausencia de marcaje. Puesto que el marcaje está asociado al ácido o ácidos nucleicos de interés mediante la hibridación de los extensores de marcaje y el sistema de sonda marcadora, la presencia o ausencia del marcaje se correlaciona con la presencia o ausencia del ácido o ácidos nucleicos de interés, y por tanto en la muestra original. El sistema de sonda marcadora incluye opcionalmente un preamplificador, un multímero de amplificación y una sonda marcadora, en el que el preamplificador es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje y con una pluralidad de multímeros de amplificación, y en el que el multímero de amplificación es capaz de hibridar simultáneamente con el preamplificador y con una pluralidad de sondas marcadoras.

Como se señala anteriormente, un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje en un subconjunto. Típicamente, el componente del sistema de sonda marcadora que hibrida con los dos o más extensores de marcaje es un multímero de

amplificación o preamplificador. Por tanto, en un aspecto, el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación o preamplificador, siendo capaz dicho multímero de amplificación o preamplificador de hibridar con los al menos dos extensores de marcaje, e hibridando el sistema de sonda marcadora con los m extensores de marcaje a una temperatura de hibridación, siendo dicha temperatura de hibridación mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el multímero de amplificación o preamplificador. La temperatura de hibridación es típicamente aproximadamente 5 °C o más mayor que la  $T_m$ , p.ej. aproximadamente 7 °C o más, aproximadamente 10 °C o más, aproximadamente 12 °C o más, aproximadamente 15 °C o más, aproximadamente 17 °C o más o incluso aproximadamente 20 °C o más que la  $T_m$ .

Cada extensor de marcaje comprende típicamente una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el correspondiente ácido nucleico de interés, y una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda de marcaje. En una clase de realizaciones, los m extensores de marcaje en un subconjunto tienen cada uno L-1 en 5' de L-2 o cada uno tiene L-1 en 3' de L-2. La longitud de L-2 puede variar. Por ejemplo, la secuencia L-2 puede ser de 20 nucleótidos o menos de longitud, p.ej. L-2 puede ser de entre 9 y 17 nucleótidos de longitud o entre 12 y 15 o entre 13 y 15 nucleótidos de longitud.

Otra clase general de realizaciones proporciona métodos de detección de uno o más ácidos nucleicos usando una configuración de extensor de marcaje. En los métodos, se proporcionan una muestra que comprende o se sospecha que comprende los ácidos nucleicos de interés, uno o más subconjuntos de m extensores de marcaje, en los que m es al menos 2, y un sistema de sonda marcadora. Cada subconjunto de m extensores de marcaje es capaz de hibridar con uno de los ácidos nucleicos de interés. El sistema de sonda marcadora comprende un marcaje, y un componente del sistema de sonda marcadora (p.ej., un preamplificador o un multímero de amplificación) es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje en un subconjunto. Cada extensor de marcaje comprende una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el correspondiente ácido nucleico de interés y una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda marcadora, y los al menos dos extensores de marcaje (p.ej., los m extensores de marcaje en un subconjunto) tienen cada uno L-1 en 5' de L-2 o tienen cada uno L-1 en 3' de L-2.

Cada ácido nucleico de interés hibrida con su correspondiente subconjunto de m extensores de marcaje, y el sistema de sonda marcadora hibrida con los m extensores de marcaje a una temperatura de hibridación. La temperatura de hibridación es mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora. Puesto que el marcaje está asociado al ácido o ácidos nucleicos de interés mediante la hibridación de los extensores de marcaje y el sistema de sonda marcadora, puede determinarse la presencia o ausencia del ácido o ácidos nucleicos de interés.

Todavía otra clase general de realizaciones proporciona métodos de captura de un marcaje con un primer ácido nucleico de interés en un ensayo multiplexado en que se van a detectar dos o más ácidos nucleicos de interés. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende el primer ácido nucleico de interés y que comprende o se sospecha que comprende también uno o más de otros ácidos nucleicos de interés. Se proporcionan también un primer subconjunto de m extensores de marcaje, en el que m es al menos 2, y un sistema de sonda marcadora que comprende el marcaje. El primer subconjunto de m extensores de marcaje es capaz de hibridar con el primer ácido nucleico de interés, y un componentes del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje en el primer subconjunto. El primer ácido nucleico de interés hibrida con el primer subconjunto de m extensores de marcaje, y el sistema de sonda marcadora hibrida los m extensores de marcaje, capturando así el marcaje con el primer ácido nucleico de interés. Esencialmente todos los rasgos señalados para las realizaciones anteriores se aplican a estos métodos también como relevantes; por ejemplo, con respecto a la configuración de los extensores de marcaje, el número de extensores de marcaje por subconjunto, la composición del sistema de sonda marcadora, el tipo de marcaje, el número de ácidos nucleicos de interés, la fuente de la muestra y/o los ácidos nucleicos y/o similares.

Todavía otra clase general de realizaciones proporciona métodos de captura de un marcaje con un ácido nucleico de interés. En los métodos, se proporcionan m extensores de marcaje, en los que m es al menos 2. Los m extensores de marcaje son capaces de hibridar con el ácido nucleico de interés. Se proporciona también un sistema de sonda marcadora que comprende el marcaje. Un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje. Cada extensor de marcaje comprende una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el ácido nucleico de interés y una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda marcadora, y los m extensores de marcaje tienen cada uno L-1 en 5' de L-2, o en los que los m extensores de marcaje tienen cada uno L-1 en 3' de L-2. El ácido nucleico de interés hibrida con los m extensores de marcaje, y el sistema de sonda marcadora hibrida con los m extensores de marcaje a una temperatura de hibridación, capturando así el marcaje con el ácido nucleico de interés. Preferiblemente, la temperatura de hibridación es mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora.

Un “extensor de marcaje” o “LE” es un polinucleótido que es capaz de hibridar con un ácido nucleico de interés y con un sistema de sonda marcadora. El extensor de marcaje tiene típicamente una primera secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica del ácido nucleico de interés, y una segunda secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica del sistema de sonda marcadora (p.ej., L-2 puede ser complementaria de una secuencia polinucleotídica de un multímero de amplificación, un preamplificador, una sonda marcadora o similar). El extensor de marcaje es preferiblemente monocatenario.

Un “sistema de sonda marcadora” comprende uno o más polinucleótidos que colectivamente comprenden un marcaje y al menos dos secuencias polinucleotídicas M-1, cada una de las cuales es capaz de hibridar con un extensor de marcaje. El marcaje proporciona una señal directa o indirectamente. La secuencia polinucleotídica M-1 es típicamente complementaria de la secuencia L-2 en los extensores de marcaje. Las al menos dos secuencias polinucleotídicas M-1 son opcionalmente secuencias idénticas o secuencias diferentes. El sistema de sonda marcadora puede incluir una pluralidad de sondas marcadoras (p.ej., una pluralidad de sondas marcajes idénticas) y un multímero de amplificación; opcionalmente incluye también un preamplificador o similar, u opcionalmente incluye solo sondas marcadoras, por ejemplo.

Un “multímero de amplificación” es un polinucleótido que comprende una pluralidad de secuencias polinucleotídicas M-2, típicamente (pero no necesariamente) secuencias polinucleotídicas M-2 idénticas. La secuencia polinucleotídica M-2 es complementaria de una secuencia polinucleotídica en la sonda marcadora. El multímero de amplificación incluye también al menos una secuencia polinucleotídica que es capaz de hibridar con un extensor de marcaje o con un ácido nucleico que hibrida con el extensor de marcaje, p.ej. un preamplificador. Por ejemplo, el multímero de amplificación incluye opcionalmente al menos una secuencia polinucleotídica M-1 (y generalmente al menos dos), opcionalmente secuencias M-1 idénticas; la secuencia polinucleotídica M-1 es típicamente complementaria de la secuencia polinucleotídica L-2 de los extensores de marcaje. De forma similar, el multímero de amplificación incluye opcionalmente al menos una secuencia polinucleotídica que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en un preamplificador. El multímero de amplificación puede ser, p.ej., un ácido nucleico lineal o ramificado. Como se señala para todos los polinucleótidos, el multímero de amplificación puede incluir nucleótidos modificados y/o ligamientos internucleotídicos no estándares, así como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o enlaces fosfodiéster estándares. Se describen multímeros de amplificación adecuados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.635.352, la patente de EE.UU. nº 5.124.246, la patente de EE.UU. nº 5.710.264 y la patente de EE.UU. nº 5.849.481.

La amplificación de señal empieza con la unión del LE con el ARNm diana. Se hibrida entonces típicamente un multímero de amplificación con los LE. El multímero de amplificación tiene generalmente múltiples copias de una secuencia que es complementaria de una sonda marcadora y puede ser un ácido nucleico de cadena ramificada; por ejemplo el multímero de amplificación puede ser un ácido nucleico ramificado, bifurcado o de tipo peine o un ácido nucleico lineal. Se enlaza covalentemente un marcaje, por ejemplo un marcaje enzimático o no enzimático, con cada sonda marcadora.

En el ejemplo precedente, el multímero de amplificación y las sondas marcadoras comprenden un sistema de sonda marcadora. En otro ejemplo, el sistema de sonda marcadora comprende también un preamplificador, p.ej. como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.635.352 y la patente de EE.UU. nº 5.681.697, que amplifica adicionalmente la señal de un único ARNm diana. En todavía otro ejemplo, los extensores de marcaje hibridan directamente con las sondas marcadoras y no se usa multímero de amplificación ni preamplificador, de modo que la señal de una única molécula de ARNm diana se amplifica solo por el número de distintos extensores de marcaje que hibridan con ese ARNm.

Entre otros aspectos, la presente invención proporciona ensayos de ADN<sub>r</sub> multiplexados que pueden usarse para la detección simultánea de dos o más ácidos nucleicos diana. De forma similar, un aspecto de la presente invención proporciona ensayos de ADN<sub>r</sub>, monoplexados o multiplexados, que tienen un fondo reducido por eventos de hibridación no específicos.

En general, en los ensayos de la invención, se usan dos o más extensores de marcaje para capturar un único componente del sistema de sonda marcadora (p.ej., un preamplificador o multímero de amplificación). La temperatura de ensayo y la estabilidad del complejo entre un único LE y el componente del sistema de sonda marcadora (p.ej., el preamplificador y el multímero de amplificación) pueden controlarse de tal modo que la unión de un único LE con el componente no sea suficiente para asociar establemente el componente a un ácido nucleico al que se une el LE, mientras que la unión simultánea de dos o más LE al componente puede capturarlo con el ácido nucleico. Requerir tal hibridación cooperativa de múltiples LE para asociación del sistema de sonda marcadora al ácido o ácidos nucleicos de interés da como resultado una alta especificidad y bajo fondo por hibridación cruzada de los LE con otros ácidos nucleicos no diana.

Para que un ensayo consiga alta especificidad y sensibilidad, preferiblemente tiene un bajo fondo resultante, p.ej., de una hibridación cruzada mínima. Típicamente, tales bajo fondo y mínima hibridación cruzada son sustancialmente más difíciles de conseguir en un ensayo multiplexado que en un ensayo monoplexado, porque el número de interacciones no específicas potenciales aumenta en gran medida en un ensayo multiplexado debido al número aumentado de sondas usadas en el ensayo (p.ej., el mayor número de CE y LE). Requerir múltiples interacciones de

LE-componente del sistema de sonda marcadora simultáneas para la captura del sistema de sonda marcadora con un ácido nucleico minimiza la oportunidad de que aparezca captura no específica, incluso aunque aparezcan algunas interacciones CE-LE o LE-CP no específicas, por ejemplo. Esta reducción del fondo mediante la minimización de los eventos de hibridación cruzada indeseables facilita por tanto la detección multiplexada de los ácidos nucleicos de interés.

El sistema de sonda marcadora incluye opcionalmente un multímero de amplificación y una pluralidad de sondas marcadoras, en el que el multímero de amplificación es capaz de hibridar con los extensores de marcaje y con una pluralidad de sondas marcadoras. En otro aspecto, el sistema de sonda marcadora incluye un preamplificador, una pluralidad de multímeros de amplificación y una pluralidad de sondas marcadoras, en el que el preamplificador hibrida con los extensores de marcaje y los multímeros de amplificación hibridan con el preamplificador y con la pluralidad de sondas marcadoras. Como otro ejemplo, el sistema de sonda marcadora puede incluir solo sondas marcadoras, que hibridan directamente con los extensores de marcaje. En una clase de realizaciones, la sonda marcadora comprende el marcaje, p.ej. un marcaje enlazado covalentemente. En otras realizaciones, la sonda marcadora está configurada para unirse a un marcaje; por ejemplo una sonda marcadora biotinilada puede unirse a un marcaje asociado a estreptavidina.

Cada extensor de marcaje incluye típicamente una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el correspondiente ácido nucleico de interés y una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda marcadora (p.ej., el preamplificador o multímero de amplificación). Resultará evidente que la cantidad de superposición entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora (concretamente, la longitud de L-2 y M-1) afecta a la T<sub>m</sub> del complejo entre el extensor de marcaje y el componente como hace, p.ej., el contenido de base de GC de las secuencias L-2 y M-1. Opcionalmente, todos los extensores de marcaje tienen la secuencia L-2 de la misma longitud y/o secuencias polinucleotídicas L-2 idénticas. Como alternativa, los diferentes extensores de marcaje pueden tener secuencias polinucleotídicas L-2 de diferente longitud y/o secuencia. Resultará también evidente que el número de extensores de marcaje requeridos para una captura estable del componente con el ácido nucleico de interés depende, en parte, de la cantidad de superposición entre los extensores de marcaje y el componente (concretamente, la longitud de L-2 y M-1).

Puede conseguirse la captura estable del componente del sistema de sonda marcadora mediante al menos dos extensores de marcaje, p.ej., minimizando la captura de ácidos nucleicos extraños, por ejemplo equilibrando el número de extensores de marcaje que se unen al componente, la cantidad de superposición entre los extensores de marcaje y el componente (la longitud de L-2 y M-1) y/o el rigor de las condiciones en las que hibridan los extensores de marcaje y el componente. Las combinaciones apropiadas de cantidad de complementariedad entre los extensores de marcaje y el componente del sistema de sonda marcadora, número de extensores de marcaje que se unen al componente y rigor de la hibridación pueden determinarse, por ejemplo, experimentalmente por un especialista en la materia. Por ejemplo, pueden seleccionarse un número particular de extensores de marcaje y un conjunto particular de condiciones de hibridación, mientras que se varía el número de nucleótidos de complementariedad entre los extensores de marcaje y el componente hasta que la hibridación de los extensores de marcaje con un ácido nucleico captura el componente con el ácido nucleico, mientras que la hibridación de un único extensor de marcaje no captura eficazmente el componente. El rigor puede controlarse, por ejemplo, controlando la concentración de formamida, la concentración de sal caotrópica, la concentración de sal, el pH, el contenido de disolvente orgánico y/o la temperatura de hibridación.

Como se señala, puede medirse directamente la T<sub>m</sub> de cualquier dúplex de ácido nucleico, usando técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, puede obtenerse una curva de desnaturalización térmica para el dúplex, cuyo punto medio corresponde a la T<sub>m</sub>. Resultará evidente que tales curvas de desnaturalización pueden obtenerse en condiciones que tienen esencialmente cualquier pH, concentración salina, contenido de disolvente y/o similares relevante.

Típicamente, el componente del sistema de sonda marcadora (p.ej., el multímero de amplificación o preamplificador) es capaz de hibridar simultáneamente con dos de los m extensores de marcaje en un subconjunto, aunque opcionalmente hibrida con 3, 4 o más de los extensores de marcaje. En una clase de realizaciones, p.ej. realizaciones en que se unen dos (o más) extensores de marcaje con el componente del sistema de sonda marcadora, la secuencia L-2 es de 20 nucleótidos o menos de longitud. Por ejemplo, L-2 puede ser de entre 9 y 17 nucleótidos de longitud, p.ej. entre 12 y 15 nucleótidos de longitud, entre 13 y 15 nucleótidos de longitud o entre 13 y 14 nucleótidos de longitud. Como se señala, m es al menos 2, y puede ser al menos 3, al menos 5, al menos 10 o más. m puede ser el mismo o diferente de subconjunto a subconjunto de extensores de marcaje.

Los extensores de marcaje pueden configurarse en cualquiera de una variedad de modos. Por ejemplo, los dos extensores de marcaje que hibridan con el componente del sistema de sonda marcadora pueden asumir una disposición cruciforme, con un extensor de marcaje teniendo L-1 en 5' de L-2 y el otro extensor de marcaje teniendo L-1 en 3' de L-2. Una configuración en que cualquiera del extremo 5' o 3' de ambos extensores de marcaje hibrida con el ácido nucleico mientras que el otro extremo se une al componente procura una unión más fuerte del componente al ácido nucleico que una disposición cruciforme de los extensores de marcaje. Por tanto, en una clase de realizaciones, los al menos dos extensores de marcaje (p.ej., los m extensores en un subconjunto) tienen cada

uno L-1 en 5' de L-2 o tiene cada uno L-1 en 3' de L-2. Por ejemplo, L-1, que hibrida con el ácido nucleico de interés, puede estar en el extremo 5' de cada extensor de marcaje, mientras que L-2, que hibrida con el componente del sistema de sonda marcadora, está en el extremo 3' de cada extensor de marcaje (o viceversa). L-1 y L-2 están opcionalmente separadas por una secuencia adicional. En una realización ejemplar, L-1 está localizada en el extremo 5' del extensor de marcaje y es de aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud, L-2 está localizada en el extremo 3' del extensor de marcaje y es de aproximadamente 13-14 nucleótidos de longitud y L-1 y L-2 están separadas por un espaciador (p.ej. 5 T).

Los métodos de la invención como se divulga en la presente memoria pueden practicarse también con las realizaciones adicionales descritas a continuación. Las etapas de dicho método pueden incluir, por ejemplo, proporcionar una muestra que comprende una célula, comprendiendo dicha célula o sospechándose que comprende una o más dianas de ácido nucleico, por ejemplo, una muestra que comprende una población de linfocitos B; proporcionar para cada diana de ácido nucleico un sistema de sonda marcadora que comprende un marcaje; proporcionar para cada diana de ácido nucleico un sistema extensor de marcaje que comprende dos o más extensores de marcaje diferentes, en el que cada uno de los dos o más extensores de marcaje comprende una sección T complementaria de una sección en la diana de ácido nucleico y una sección L complementaria de una sección en un componente del sistema de sonda marcadora, y en el que las secciones T son complementarias de regiones no superpuestas de la diana de ácido nucleico, y las secciones L son complementarias de regiones no superpuestas del sistema de sonda marcadora; hibridar, en la célula, el sistema de extensores de marcaje con la diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, proporcionando así la hibridación de dos o más extensores de marcaje diferentes con una única copia de la molécula diana de ácido nucleico; capturar, en la célula y en presencia de ácidos nucleicos no diana celulares, el sistema de sonda marcadora con el sistema extensor de marcaje hibridado con la molécula diana de ácido nucleico, capturando así el marcaje con la diana de ácido nucleico, en el que la captura ocurre mediante hibridación simultánea de al menos dos extensores de marcaje diferentes con una única molécula del componente del sistema de sonda marcadora que es complementaria de los extensores de marcaje y detectar una señal del marcaje,

Una realización puede incluir hibridar los al menos dos extensores de marcaje diferentes con la única molécula del componente del sistema de sonda marcadora que es complementaria de los extensores de marcaje, que se practica a una temperatura de hibridación que es mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora, por ejemplo sonda marcadora, amplificador o preamplificador. En otra realización, los al menos dos extensores de marcaje diferentes hibridan con secciones adyacentes en la diana de ácido nucleico. También, hibridar los dos o más extensores de marcaje con la única molécula de la diana de ácido nucleico puede practicarse a una temperatura de hibridación que es mayor que la temperatura de fusión  $T_m$  de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y la diana de ácido nucleico. Otra realización puede comprender además proporcionar una o más sondas de bloqueo capaces de hibridar con regiones de la diana de ácido nucleico no ocupadas por los extensores de marcaje. En aún otra realización, se logra cada etapa de hibridación o captura para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo. En una realización adicional, la una o más dianas de ácido nucleico puede comprender un ácido nucleico de referencia, y en la que el método comprende normalizar la señal de la una o más dianas de ácido nucleico con la señal del ácido nucleico de referencia. Una realización adicional más puede comprender la etapa de correlacionar la intensidad de la señal de cada diana de ácido nucleico con una cantidad de la correspondiente diana de ácido nucleico presente en la célula. La muestra que comprende la célula puede derivar de un fluido corporal, de sangre o una sección de tejido, como se divulga en la presente memoria. La célula puede estar en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección, pero se practica típicamente como un ensayo de hibridación *in situ*.

En una realización particular, cada extensor de marcaje está en configuración "Z", en la que la configuración Z comprende la sección T del extensor de marcaje en el extremo 5' y la sección L del extensor de marcaje en el extremo 3', o la sección T del extensor de marcaje en el extremo 3' y la sección L del extensor de marcaje en el extremo 5'. En otra realización, el sistema de sonda marcadora comprende (A) (i) una sonda marcadora que comprende uno o más marcajes o (B) (i) una o más sondas marcadoras y (ii) un amplificador capaz de hibridar con una o más de las sondas marcadoras, o (C) (i) una o más sondas marcadoras, (ii) uno o más amplificadores y (iii) un preamplificador capaz de hibridar con uno o más de los amplificadores. En una realización adicional, se captura el marcaje con la molécula diana de ácido nucleico mediante hibridación de la sonda marcadora con los al menos dos extensores de marcaje diferentes hibridados con la molécula diana de ácido nucleico. En una realización adicional más, se captura el marcaje con la molécula diana de ácido nucleico mediante hibridación de la una o más sondas marcadoras con la molécula amplificadora hibridada con los al menos dos extensores de marcaje diferentes hibridados con la molécula diana de ácido nucleico. En todavía otra realización, se captura el marcaje con la molécula diana de ácido nucleico mediante hibridación de la una o más sondas marcadoras con el uno o más amplificadores hibridados con la molécula preamplificadora hibridada con los al menos dos extensores de marcaje diferentes hibridados con la molécula diana de ácido nucleico. En una realización adicional más, se proporciona una pluralidad de sistemas de sonda marcadora para cada ácido nucleico diana y en la que dos o más sistemas de sonda marcadora se capturan con el ácido nucleico diana usando el sistema extensor de marcaje que comprende dos o más extensores de marcaje diferentes, y en la que cada extensor de marcaje en el sistema extensor de marcaje comprende una sección T que es complementaria de regiones no superpuestas de la diana de ácido nucleico. En todavía otra realización, se capturan tres o más sistemas de sonda marcadora con el ácido nucleico

diana por el sistema extensor de marcaje.

Los métodos de la invención pueden incluir adicionalmente aspectos adicionales como se describe a continuación. Por ejemplo, los métodos pueden incluir además un método de detección de uno o más ácidos nucleicos de interés, comprendiendo el método: a) proporcionar una muestra que comprende o se sospecha que comprende el uno o más ácidos nucleicos de interés; b) marcar esos ácidos nucleicos de interés presentes en la muestra usando los métodos divulgados en la presente memoria; c) proporcionar uno o más subconjuntos de m extensores de marcaje, en los que m es al menos 2, en los que cada subconjunto de m extensores de marcaje es capaz de hibridar con uno de los ácidos nucleicos de interés; d) proporcionar un sistema de sonda marcadora que comprende un marcaje, en los que un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje en un subconjunto, en los que cada uno de los al menos dos extensores de marcaje comprende una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el correspondiente ácido nucleico de interés, y comprende una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda marcadora, en los que los al menos dos extensores de marcaje tienen todos L-1 en 5' de L-2, o tienen todos L-1 en 3' de L-2, y en los que los m extensores de marcaje en el subconjunto son complementarios de secuencias no superpuestas en el correspondiente ácido nucleico de interés; e) hibridar cualquier ácido nucleico de interés capturado con su correspondiente subconjunto de m extensores de marcaje; f) hibridar el sistema de sonda marcadora con los m extensores de marcaje a una temperatura de hibridación, siendo dicha temperatura de hibridación mayor que la temperatura de fusión T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora y g) detectar la presencia o ausencia del marcaje en el ácido nucleico diana.

En una realización particular, el sistema de sonda marcadora comprende un preamplificador, un multímero de amplificación y una sonda marcadora; en el que el preamplificador es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje y con una pluralidad de multímeros de amplificación; en el que el multímero de amplificación es capaz de hibridar simultáneamente con el preamplificador y con una pluralidad de sondas marcadoras; y en el que la sonda marcadora comprende el marcaje. En otra realización, uno o más ácidos nucleicos de interés comprenden dos o más ácidos nucleicos de interés diferentes, siendo dichos ácidos nucleicos de interés diferentes moléculas de ácido nucleico diferentes, y en el que el uno o más subconjuntos de los m extensores de marcaje comprenden dos o más subconjuntos diferentes de los m extensores de marcaje. En una realización particular, el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación o preamplificador, siendo dicho multímero de amplificación o preamplificador capaz de hibridar con al menos dos extensores de marcaje.

En una realización, la temperatura de hibridación es aproximadamente 5 °C o más mayor que la T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora. Como alternativa, la temperatura de hibridación es aproximadamente 7 °C o más, aproximadamente 10 °C o más, aproximadamente 12 °C o más, aproximadamente 15 °C o más, aproximadamente 17 °C o más o aproximadamente 20 °C o más mayor que la T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora. En otra realización, la secuencia polinucleotídica L-2 es de 20 nucleótidos o menos de longitud. Como alternativa, L-2 es de entre 9 y 17 nucleótidos de longitud. Como alternativa, L-2 es de entre 13 y 15 nucleótidos de longitud.

En otra realización, cada uno de los al menos dos extensores de marcaje tiene L-1 en su extremo 5' y L-2 en su extremo 3'. En aún otra realización, cada uno de los al menos dos extensores de marcaje tiene L-1 en su extremo 3' y L-2 en su extremo 5'. En aún otra realización, los m extensores de marcaje en un subconjunto tienen todos L-1 en 5' de L-2 o tienen todos L-1 en 3' de L-2. En otra realización, el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación y una sonda marcadora; en la que el multímero de amplificación es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje y con una pluralidad de sondas marcadoras; y en la que la sonda marcadora comprende el marcaje. En otra realización, el sistema de sonda marcadora comprende una sonda marcadora; en la que la sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje; y en la que la sonda marcadora comprende el marcaje. En otra realización, el componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con dos de los m extensores de marcaje en un subconjunto.

Un método de la invención puede implicar además capturar un marcaje con un ácido nucleico de interés a) proporcionando m extensores de marcaje, en el que m es al menos 2, en el que los m extensores de marcaje son capaces de hibridar con secuencias no superpuestas del ácido nucleico de interés; b) proporcionando un sistema de sonda marcadora que comprende el marcaje, en el que un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje, en el que cada uno de los al menos dos extensores de marcaje comprende una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el ácido nucleico de interés y comprende una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda marcadora, y en el que los al menos dos extensores de marcaje tienen todos L-1 en 5' de L-2 o tienen todos L-1 en 3' de L-2; c) hibridando el ácido nucleico de interés con los m extensores de marcaje y d) hibridando el sistema de sonda marcadora con los m extensores de marcaje a una temperatura de hibridación, siendo dicha temperatura de hibridación mayor que la temperatura de fusión T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de

sonda marcadora, capturando así el marcaje con el ácido nucleico de interés.

En una realización, los m extensores de marcaje tienen todos L-1 en 5' de L-2 o tienen todos L-1 en 3' de L-2. En una realización, el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación o preamplificador, siendo dicho multímero de amplificación o preamplificador capaz de hibridar con al menos dos de los m extensores de marcaje. En una realización, el sistema de sonda marcadora comprende un preamplificador, un multímero de amplificación y una sonda marcadora, en el que el preamplificador es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje y con una pluralidad de multímeros de amplificación; en el que el multímero de amplificación es capaz de hibridar simultáneamente con el preamplificador y con una pluralidad de sondas marcadoras; y en el que la sonda marcadora comprende el marcaje. En una realización, el sistema de sonda marcadora comprende un multímero de amplificación y una sonda marcadora; en el que el multímero de amplificación es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje y con una pluralidad de sondas marcadoras y en el que la sonda marcadora comprende el marcaje. En una realización, el sistema de sonda marcadora comprende una sonda marcadora; en el que la sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos 2 de los m extensores de marcaje; y en el que la sonda marcadora comprende el marcaje. En una realización, el componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con 2 de los m extensores de marcaje. En una realización, la temperatura de hibridación es aproximadamente 5 °C o más mayor que la T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente en el sistema de sonda marcadora. En una realización, la temperatura de hibridación es aproximadamente 7 °C o más, aproximadamente 10 °C o más, aproximadamente 12 °C o más, aproximadamente 15 °C o más, aproximadamente 17 °C o más o aproximadamente 20 °C o más mayor que la T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora. En una realización, la secuencia polinucleotídica L-2 es de 20 nucleótidos o menos de longitud. En una realización, L-2 es de entre 9 y 17 nucleótidos de longitud. En una realización, L-2 es de entre 13 y 15 nucleótidos de longitud. En una realización, cada uno de los al menos dos extensores de marcaje tiene L-1 en su extremo 5' y L-2 en su extremo 3'. En una realización, cada uno de los al menos dos extensores de marcaje tiene L-1 en su extremo 3' y L-2 en su extremo 5'.

Una realización adicional puede incluir un método de detección de uno o más ácidos nucleicos de interés a) proporcionando una muestra que comprende el uno o más ácidos nucleicos de interés; b) marcando los ácidos nucleicos de interés usando los métodos divulgados en la presente memoria; c) proporcionando un sistema de sonda marcadora que comprende un marcaje; d) para cada uno de los ácidos nucleicos de interés, proporcionando un subconjunto de m extensores de marcaje, en el que m es al menos 2, en el que el subconjunto de m extensores de marcaje es capaz de hibridar con ese ácido nucleico de interés, en el que un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje en el subconjunto, en el que cada uno de los al menos dos extensores de marcaje comprende una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el ácido nucleico de interés y comprende una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda marcadora, y en el que los al menos dos extensores de marcaje tienen todos L-1 en 5' de L-2 o tienen todos L-1 en 3' de L-2; e) hibridando cada ácido nucleico de interés con su correspondiente subconjunto de m extensores de marcaje; f) hibridando el sistema de sonda marcadora con los extensores de marcaje a una temperatura de hibridación, siendo dicha temperatura de hibridación mayor que la temperatura de fusión T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora, con lo que, para cada uno de los ácidos nucleicos de interés, una única copia de cada uno de los al menos dos extensores de marcaje hibrida simultáneamente con una única copia del ácido nucleico de interés y con una única copia del componente del sistema de sonda marcadora y g) detectando la presencia o ausencia del marcaje en el ácido nucleico diana.

En todavía otra realización, un método puede incluir capturar un marcaje con un ácido nucleico de interés: a) proporcionando m extensores de marcaje, en el que m es al menos 2, en el que los m extensores de marcaje son capaces de hibridar con el ácido nucleico de interés; b) proporcionando un sistema de sonda marcadora que comprende el marcaje, en el que un componente del sistema de sonda marcadora es capaz de hibridar simultáneamente con al menos dos de los m extensores de marcaje, en el que cada uno de los al menos dos extensores de marcaje comprende una secuencia polinucleotídica L-1 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el ácido nucleico de interés y comprende una secuencia polinucleotídica L-2 que es complementaria de una secuencia polinucleotídica en el componente del sistema de sonda marcadora, y en el que los al menos dos extensores de marcaje tienen todos L-1 en 5' de L-2 o tienen todos L-1 en 3' de L-2; c) hibridando el ácido nucleico de interés con los m extensores de marcaje y d) hibridando el sistema de sonda marcadora con los m extensores de marcaje a una temperatura de hibridación, siendo dicha temperatura de hibridación mayor que la temperatura de fusión T<sub>m</sub> de un complejo entre cada extensor de marcaje individual y el componente del sistema de sonda marcadora, con lo que una única copia de cada uno de los al menos dos extensores de marcaje hibrida simultáneamente con una única copia del ácido nucleico de interés y con una única copia del componente del sistema de sonda marcadora, capturando así el marcaje con el ácido nucleico de interés.

Se entiende que se proporcionan también en la definición de la invención proporcionada en la presente memoria modificaciones que no afectan sustancialmente a la actividad de las diversas realizaciones de esta invención. Por consiguiente, se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, pero no limiten, la presente invención.

**EJEMPLO****Detección de restricción de cadena ligera de inmunoglobulina en linfocitos B usando hibridación *in situ***

Este ejemplo describe ensayos de hibridación *in situ* para detectar restricción de cadena ligera de inmunoglobulina en linfocitos B.

Un ensayo RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics) para detectar ARNm de cadena ligera kappa y lambda de Ig para detectar LCR en muestras tanto de trastornos linfoides proliferativos como de neoplasias de linfocitos B. Se diseñaron sondas de RNAscope® para apuntar a los genes de IGKC (región constante de la cadena kappa de inmunoglobulina) e IGLC (región constante de cadena lambda de inmunoglobulina), que codifican la región constante de la cadena ligera kappa y lambda, respectivamente. El ensayo RNAscope® es capaz de detectar muy bajos niveles de transcritos de kappa/lambda (<10 copias/célula) en linfocitos B en amígdala humana (Wang *et al.*, 2012). Se describe a continuación la aplicación de un ensayo RNAscope® y el desarrollo de un algoritmo de interpretación de la detección de LCR en enfermedades proliferativas de linfocitos B. Cuando se tiñeron secciones de tejido de una amplia variedad de enfermedades linfoproliferativas en que se habían evaluado los linfomas de linfocitos B con sondas de kappa y lambda, se detectaron 5 patrones de expresión. Estos experimentos y resultados se describen a continuación con más detalle.

Las Figuras 1A y 1B muestran ejemplos de una expresión de cadena ligera claramente restringida en linfomas restringidos a kappa (patrón 1, Figura 1A, panel izquierdo) y restringidos a lambda (patrón 2, Figura 1B, panel derecho), donde se expresaba una de las dos cadenas ligeras en las células tumorales. La tinción fuerte de lambda en algunas células de la Figura 1A era de células plasmáticas no malignas, que producen altos niveles de cadenas ligeras. La tinción de kappa fuera de la región tumoral en la Figura 1B era de linfocitos B normales. Este tipo de patrón de expresión restringido a kappa (patrón 1) o restringido a lambda (patrón 2) se ha usado tradicionalmente como diagnóstico para linfoma de linfocitos B en una muestra que exhibe un fenotipo clonal restringido a kappa o restringido a lambda.

La Figura 2 muestra un ejemplo de un tercer patrón de tinción. En este caso de linfoma restringido a kappa como se determina por citometría de flujo, se detectaron también células de tinción positiva de lambda en la misma región de expresión de kappa, haciendo difícil concluir si estas células estaban restringidas a kappa.

Las Figuras 3A y 3B muestran otro ejemplo del mismo patrón, donde se detectaron células de tinción de lambda en la misma región que las células de tinción de kappa. Se practicó un experimento para determinar si las señales lambda derivaban de sondas que hibridan con ADN genómico en los 7 loci de IGLC. Se pretrató una sección de tejido adyacente con ARNasa y se tiñó entonces con la sonda de lambda. El tratamiento con ARNasa eliminaba las señales lambda, demostrando que las señales detectadas por la sonda de lambda se originaban en ARN.

Se examinó el mapa genómico de los genes de IGLC. Se señaló que la secuencia de IGLC1 es también el tercer exón de un gen llamado IGLL5 (polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina; NCBI ENTREZ Gene ID 100423062). Por lo tanto, la sonda de lambda apuntada a IGLC puede detectar expresión de IGLC1 o de IGLL5. Se ha mostrado que IGLL5 se expresa en linfocitos B del locus de IGLC no reordenado (Evans y Hollis, *J. Experimental Med.*, 173: 305-311(1991); Guglielmi y Davi, *Eur. J. Immunol.*, 21: 501-508 (1991)). La Figura 4 muestra un diagrama esquemático de una porción del cromosoma humano 22 en una región que codifica la cadena ligera lambda de Ig. Como se representa en el diagrama de la Figura 4, los transcritos de *IGLL5* comparten secuencias con la cadena ligera de inmunoglobulina canónica. Con respecto a IGLL5, puede caracterizarse como sigue: (1) la expresión de *IGLL5* no requiere reordenación génica; (2) el exón 1 y parte del exón 2 de *IGLL5* se eliminan durante la reordenación V-J de lambda de Ig; (3) *IGLL5* se expresa solo en linfocitos B productores de kappa y a niveles altamente variables y (4) la función de *IGLL5* y si se produce la proteína IGLL5 es desconocido. La estructura de exón-intrón de IGLL5 puede encontrarse en [ncbi.nlm.nih.gov/gene/100423062](http://ncbi.nlm.nih.gov/gene/100423062) (NCBI ENTREZ Gene ID 100423062). Pueden encontrarse las secuencias de dos ARNm de IGLL5 cortados y empalmados alternativamente en los accesos a GenBank NM-001178126.1 y NM-001256296.1.

Para mostrar que las señales lambda detectadas en el tercer patrón de expresión de kappa y lambda (Figuras 2 y 3) podrían proceder de IGLL5, se diseñaron sondas específicas de IGLL5 apuntadas al exón 1 de IGLL5 (Figura 4). Las Figuras 5A-5D muestran la tinción de secciones de tejido con sondas de lambda e IGLL5. Las Figuras 5A y 5B muestran la tinción de secciones de tejido adyacentes con sondas de lambda e IGLL5, respectivamente. Las Figuras 5C y 5D muestran un ensayo duplexado que usa sondas de lambda e IGLL5 detectadas por fluorescencia o un ensayo cromogénico, respectivamente. Cuando se teñían secciones adyacentes con sondas de lambda e IGLL5, los patrones de señal eran casi idénticos (Figuras 5A y 5B), como se esperaba si ambas sondas de IGLL5 y lambda detectaban los mismos transcritos de IGLL5. Para confirmar adicionalmente esto, se practicó un ensayo de hibridación duplexado con sondas de lambda e IGLL5. Se practicó la detección con fluorescencia de IGLL5 (rojo; Alexa Fluor™ 647) y lambda (verde; Alexa Fluor™ 488) en la muestra (Figura 5C). Ambas señales se localizaron en las mismas células, y muchas señales se superponían produciendo puntos amarillos en la imagen combinada, indicando que se detectaban los mismos transcritos por ambas sondas. Las señales verdes y rojas no superpuestas en estas células eran probablemente debidas a una hibridación incompleta que daba como resultado que solo una de las dos sondas hibridara exitosamente con sus dianas. Se observaron resultados similares en un ensayo

duplexado practicado con tinción cromogénica (Figura 5D), donde lambda se teñía de verde (HRP-Green; 42 Life Sciences GmbH & Co.; Bremerhaven, Alemania) e IGLL5 se teñía de rojo (Fast Red). Estos experimentos, junto con la bibliografía conocida referente a IGLL5, condujeron a la conclusión de que el tercer patrón, cuando hay coexpresión de kappa y lo que parece ser lambda, era debido a expresión de IGLL5.

En otro experimento, se usaron tres sondas, de kappa, lambda e IGLL5, para analizar linfomas de linfocitos B. De forma interesante, se observó un cuarto patrón de expresión en algunas muestras (Figura 6). En este patrón, estaban presentes señales de kappa y lambda en las mismas células, como se demostraba por tinción duplexada (panel inferior derecho en la Figura 6), pero se detectaba poca o ninguna señal de IGLL5 (panel inferior izquierdo en la Figura 6). Por lo tanto, las señales de lambda observadas no eran de IGLL5. Por tanto, en estas células, se expresaban ambas cadenas ligeras kappa y lambda y por tanto no estaban restringidas. Este patrón no restringido marcaba aún una población clonal de células, puesto que todas las células mostraban el mismo patrón no restringido. Este patrón clonal no restringido es diferente del patrón policlonal no restringido (Patrón 5) mostrado en la Figura 7. En este último caso, se veían señales de kappa y lambda en células diferentes, lo que es típico de enfermedades linfoproliferativas benignas. Se ha descrito la expresión de cadena ligera dual en linfomas de linfocitos B antes basándose en citometría de flujo que detecta proteínas de cadena ligera (Xu, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130: 853-856 (2006)). Los resultados aquí descritos y mostrados en la Figura 6 representan la primera demostración conocida de expresión de cadena ligera dual a nivel de ARNm.

Los resultados descritos anteriormente han conducido al desarrollo de un esquema o algoritmo que proporciona la determinación de la restricción de cadena ligera basándose en patrones de expresión de ARNm de kappa, lambda e IGLL5 (véase la Figura 8). Se muestra una implementación del esquema o algoritmo en la Figura 8. Debido a los patrones múltiples observados de expresión de ARNm de kappa, lambda e IGLL5, como se describe anteriormente, se implementó un ensayo duplexado de dos colores en 2 portaobjetos como se muestra en la Figura 8. En la realización ejemplificada, se tiñe un portaobjetos con sondas de kappa (negro u otro sistema de detección adecuado y distinguible) y lambda (rojo u otro sistema de detección adecuado y distinguible), y se tiñe el otro portaobjetos con dapB (negro u otro sistema de detección adecuado y distinguible) e IGLL5 (rojo u otro sistema de detección adecuado y distinguible). Se usa el gen bacteriano dapB como control negativo. Los patrones 1 (restringido a kappa), 2 (restringido a lambda) y 5 (no restringido, policlonal) pueden interpretarse fácilmente basándose en el portaobjetos de kappa/lambda solo. Sin embargo, si se detectan ambas señales de kappa y lambda en las mismas células, puede examinarse el portaobjetos de dapB/IGLL5 para distinguir entre los patrones 4 y 5. Si las señales de IGLL5 son similares o incluso mayores que las señales de sonda de lambda, indica restricción a kappa. Si las señales de IGLL5 están ausentes o son mucho menores que las señales de sonda de lambda, indica un patrón clonal no restringido. Por lo tanto, analizando estos 3 genes, a saber la expresión de kappa y lambda y opcionalmente la expresión de IGLL5, y aplicando el sistema de interpretación y el algoritmo representado en la Figura 8, pueden determinarse inequívocamente LCR y clonalidad.

Estos resultados proporcionan un ensayo altamente sensible, preciso y rápido para determinar la restricción de cadena ligera, particularmente en células que tienen una baja expresión de kappa y/o lambda, así como para identificar poblaciones de linfocitos B clonales que exhiben una coexpresión aparente o real de kappa y lambda. El ensayo puede usarse por lo tanto para identificar muestras clonales y probablemente neoplásicas que de otro modo se habrían identificado como negativas o indeterminadas con respecto a la restricción de cadena ligera.

# REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y clonalidad en linfocitos B, comprendiendo el método:
  - (a) realizar un ensayo de hibridación *in situ* duplexado en una muestra de linfocitos B de un sujeto usando
    - 5 al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN de la región constante de la cadena kappa de inmunoglobulina (IGKCR);
    - al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN de la región constante de la cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR); y
    - 10 al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar específicamente con ARN del polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina (IGLL5);
  - (b) detectar la señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada, la señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada y la señal asociada a la sonda de IGLL5 hibridada en una población de linfocitos B en la muestra; y
  - (c) determinar el patrón de señal asociada a la sonda de IGKCR hibridada, la sonda de IGLCR hibridada y la sonda de IGLL5 hibridada en células individuales de la población de linfocitos B,
  - 15 en el que
  - el patrón donde están presentes tanto señal asociada a la sonda de IGLCR como señal asociada a la sonda de IGLCR en el mismo linfocito B, y donde el nivel de señal asociada a la sonda de IGLL5 hibridada es mayor o igual al nivel de señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada, indica restricción a kappa; o
  - 20 el patrón donde están presentes tanto señal asociada a la sonda de IGKCR como señal asociada a la sonda de IGLCR en el mismo linfocito B, y donde el nivel de señal asociada a la sonda de IGLL5 hibridada es menor que el nivel de señal asociada a la sonda de IGLCR hibridada, indica una muestra clonal no restringida.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el ensayo de hibridación *in situ* se realiza como reacciones monoplexadas en secciones en serie.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la hibridación del conjunto de sondas de IGKCR y el conjunto de sondas de IGLCR se hibrida en el mismo ensayo de hibridación *in situ*.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que la hibridación del conjunto de sondas de IGLL5 es en un ensayo de hibridación *in situ* separado del ensayo en que se hibridan el conjunto de sondas de IGKCR y el conjunto de sondas de IGLCR.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además usar al menos un conjunto de sondas de control negativo.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la muestra es una sección de tejido o una sección de coágulo de médula ósea.
7. El método de la reivindicación 6 en el que la sección de tejido o sección de coágulo de médula ósea está fijada con formalina y embebida en parafina.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el sujeto es un ser humano.
9. Un kit para detectar restricción de cadena ligera de inmunoglobulina y clonalidad en linfocitos B humanos, que comprende agentes para realizar un ensayo de hibridación de ARN *in situ* que incluye:
  - al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar con ARN de polipéptido 5 de tipo lambda de inmunoglobulina (IGLL5);
  - 40 al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar con ARN de la región constante de la cadena kappa de inmunoglobulina (IGKCR);
  - al menos un conjunto de sondas que se diseña para hibridar con ARN de la región constante de la cadena lambda de inmunoglobulina (IGLCR); y
  - un sistema de amplificación de señal.
- 45 10. El kit de la reivindicación 9, que comprende además al menos un conjunto de sondas de control negativo.

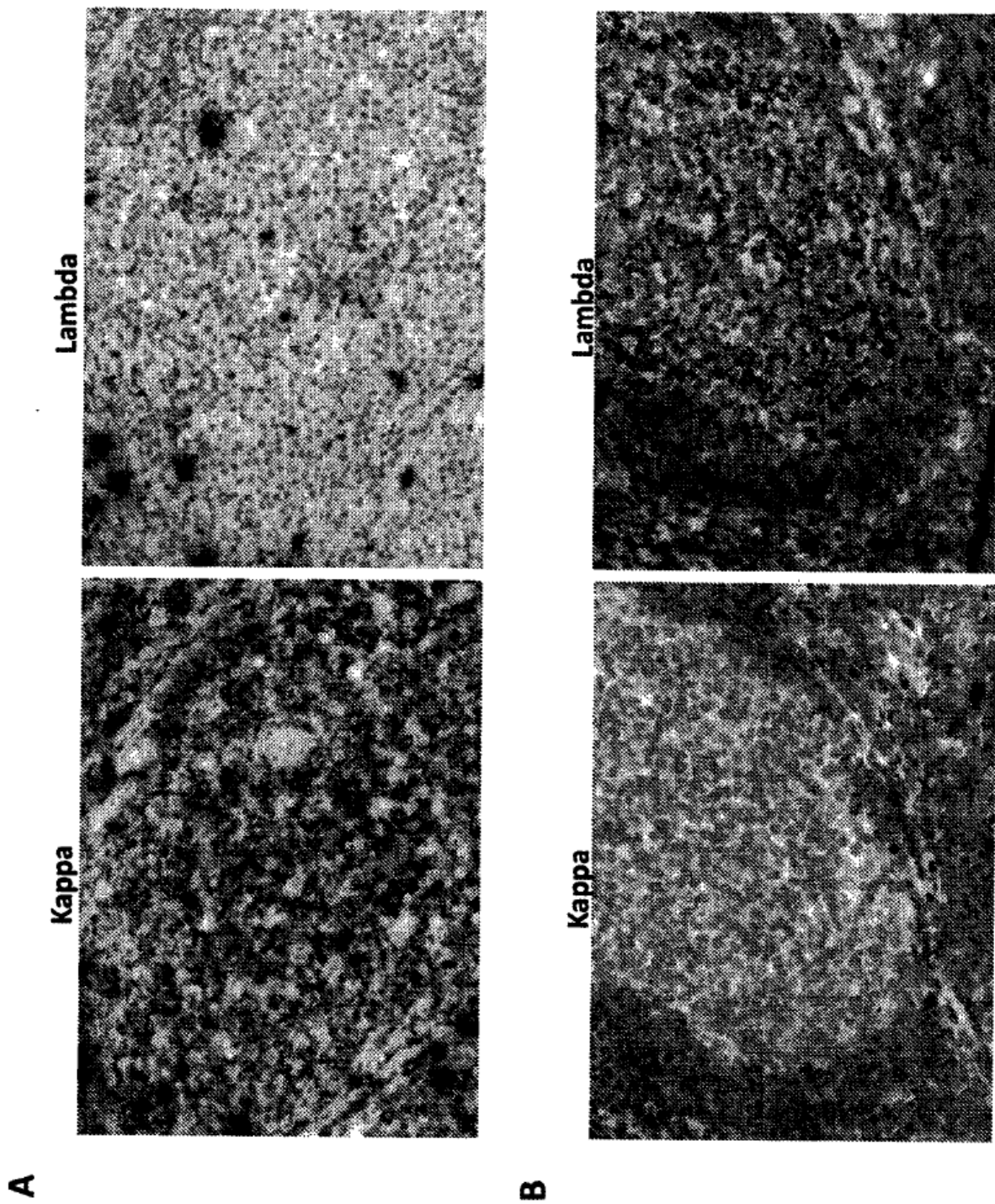


Fig. 1

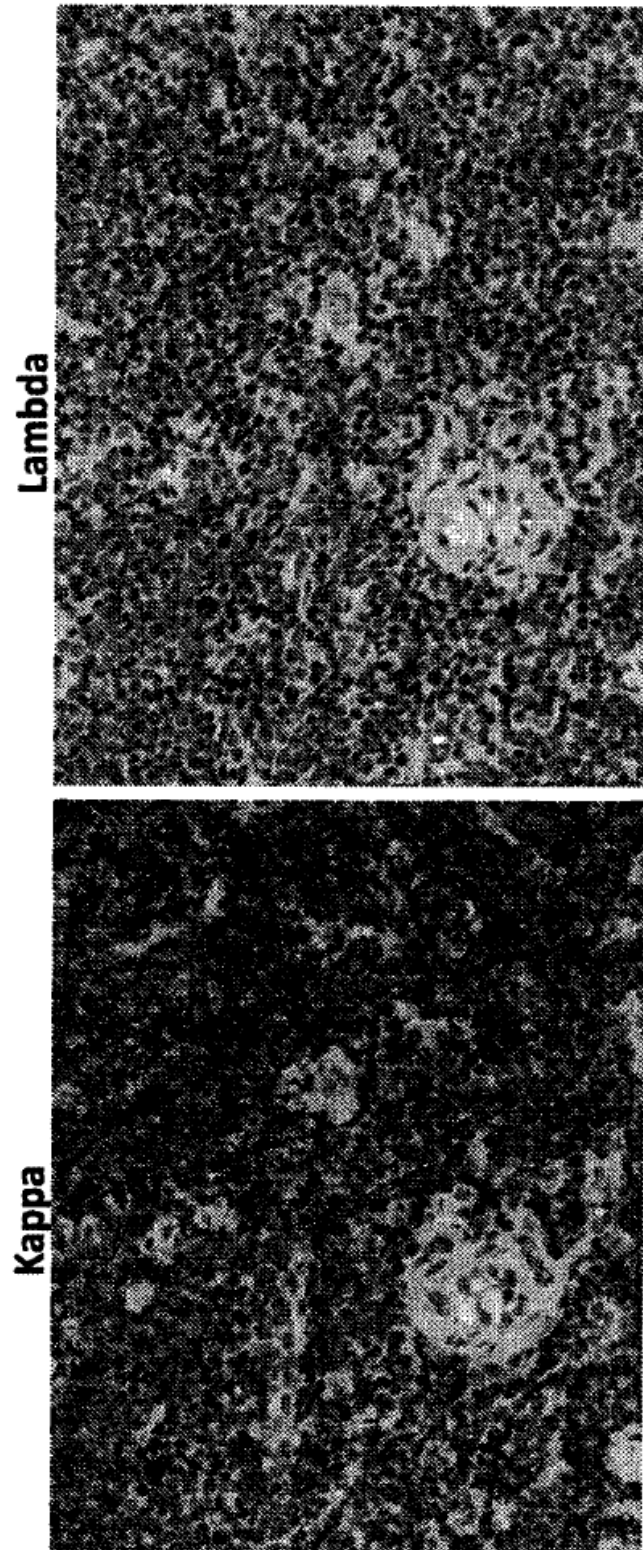


Fig. 2

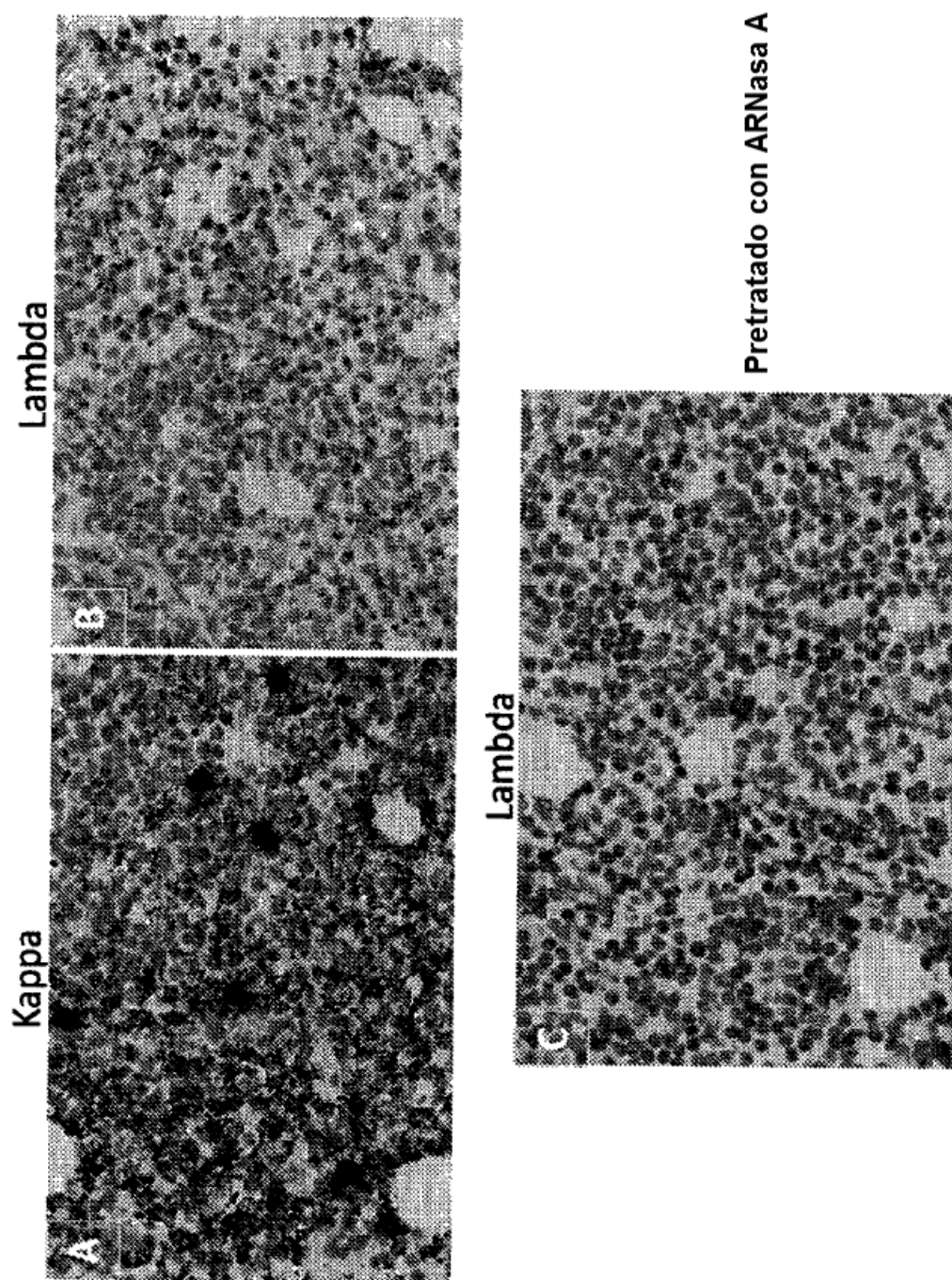
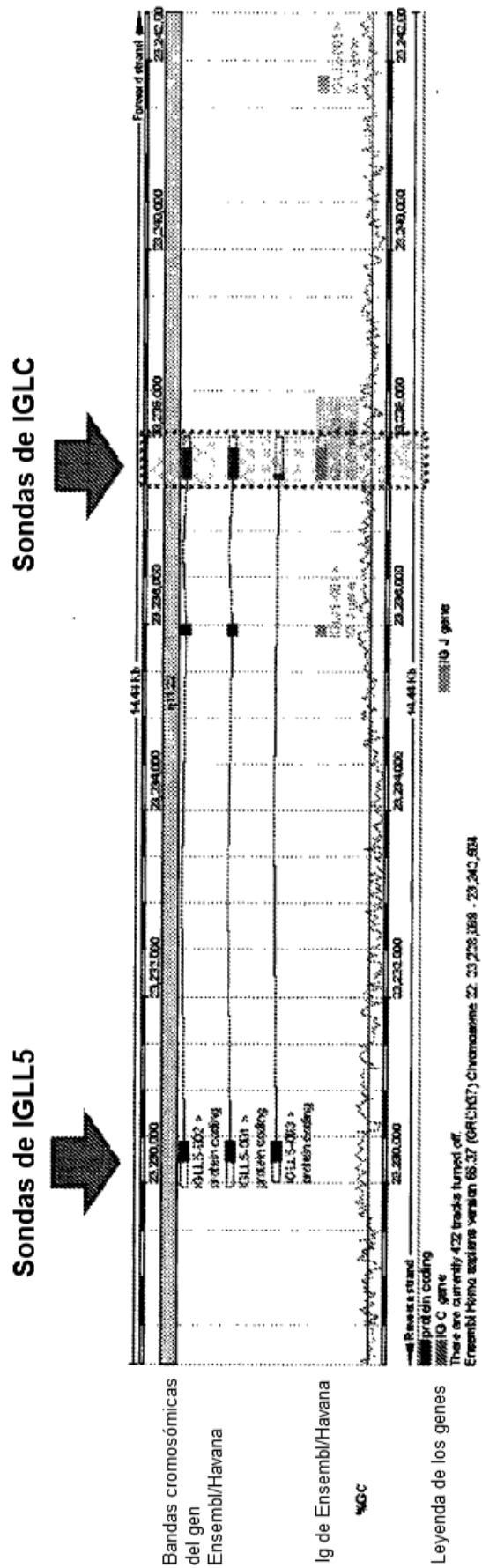


Fig. 3



**Fig. 4**

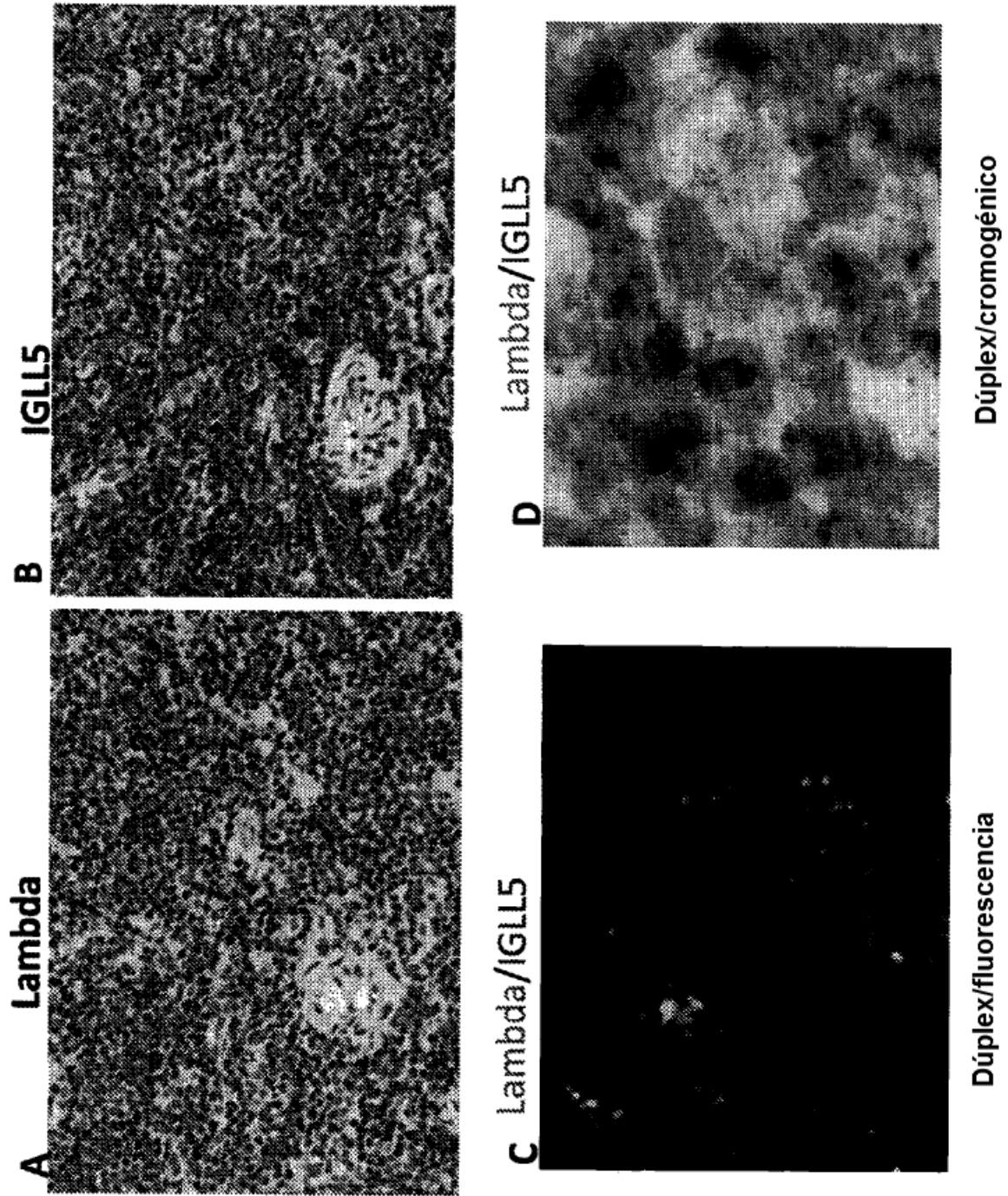
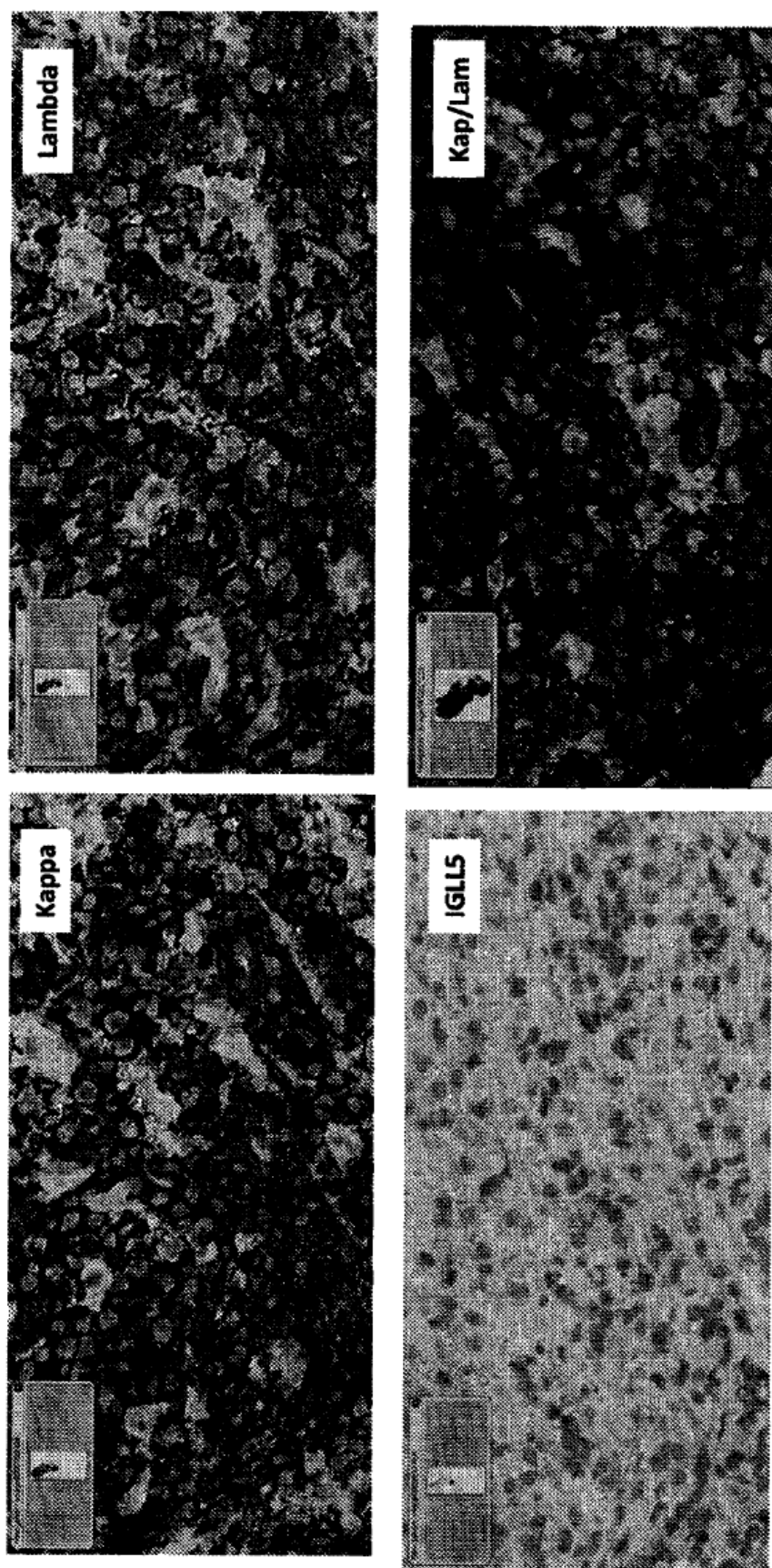
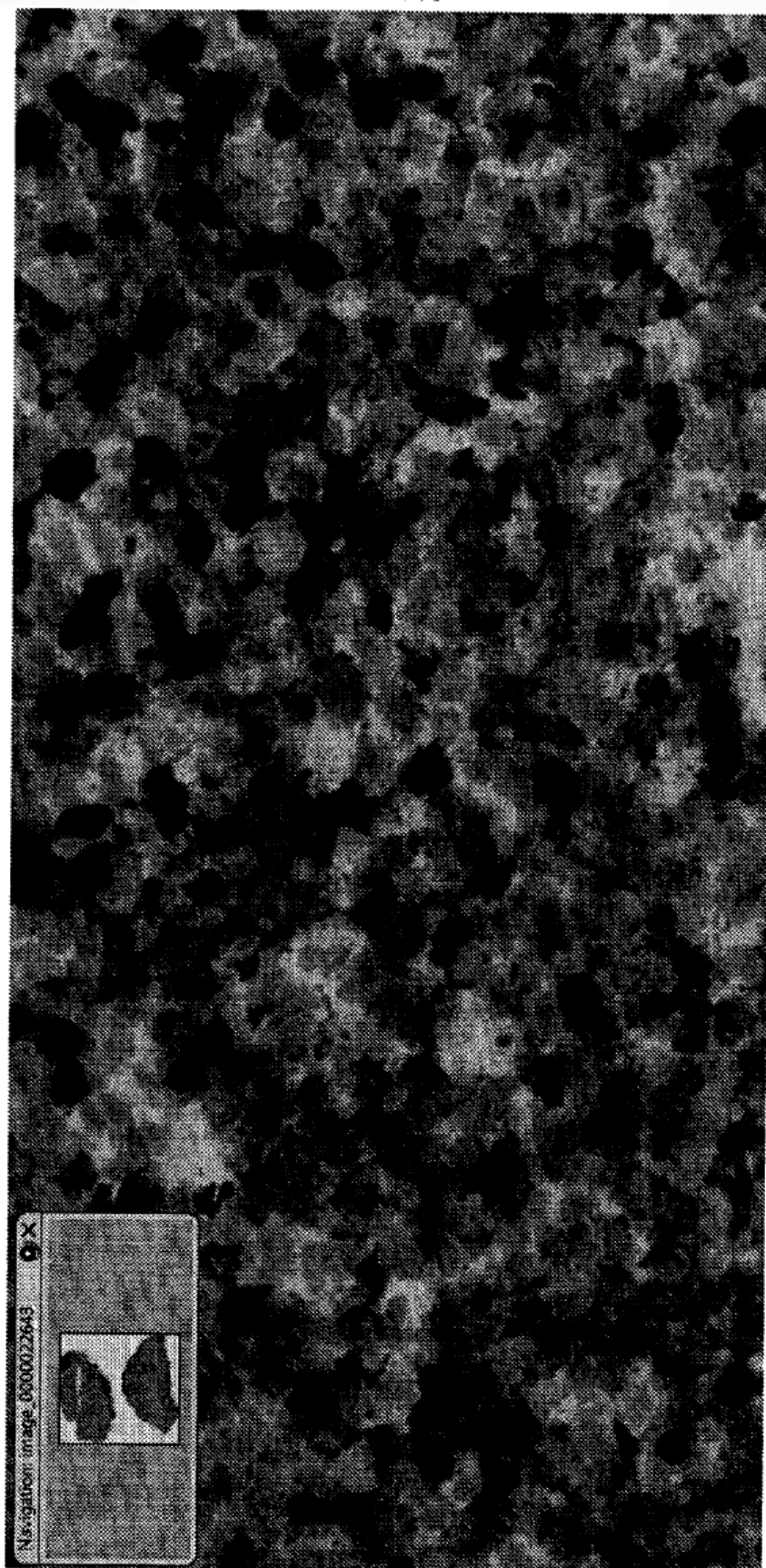


Fig. 5



Tinción duplexada: kappa, DAB (marrón), lambda, Fast Red (rojo)

Fig. 6



Tinción duplexada: kappa, Deep Space Black (negro);  
lambda, Fast Red (rojo)

Fig. 7

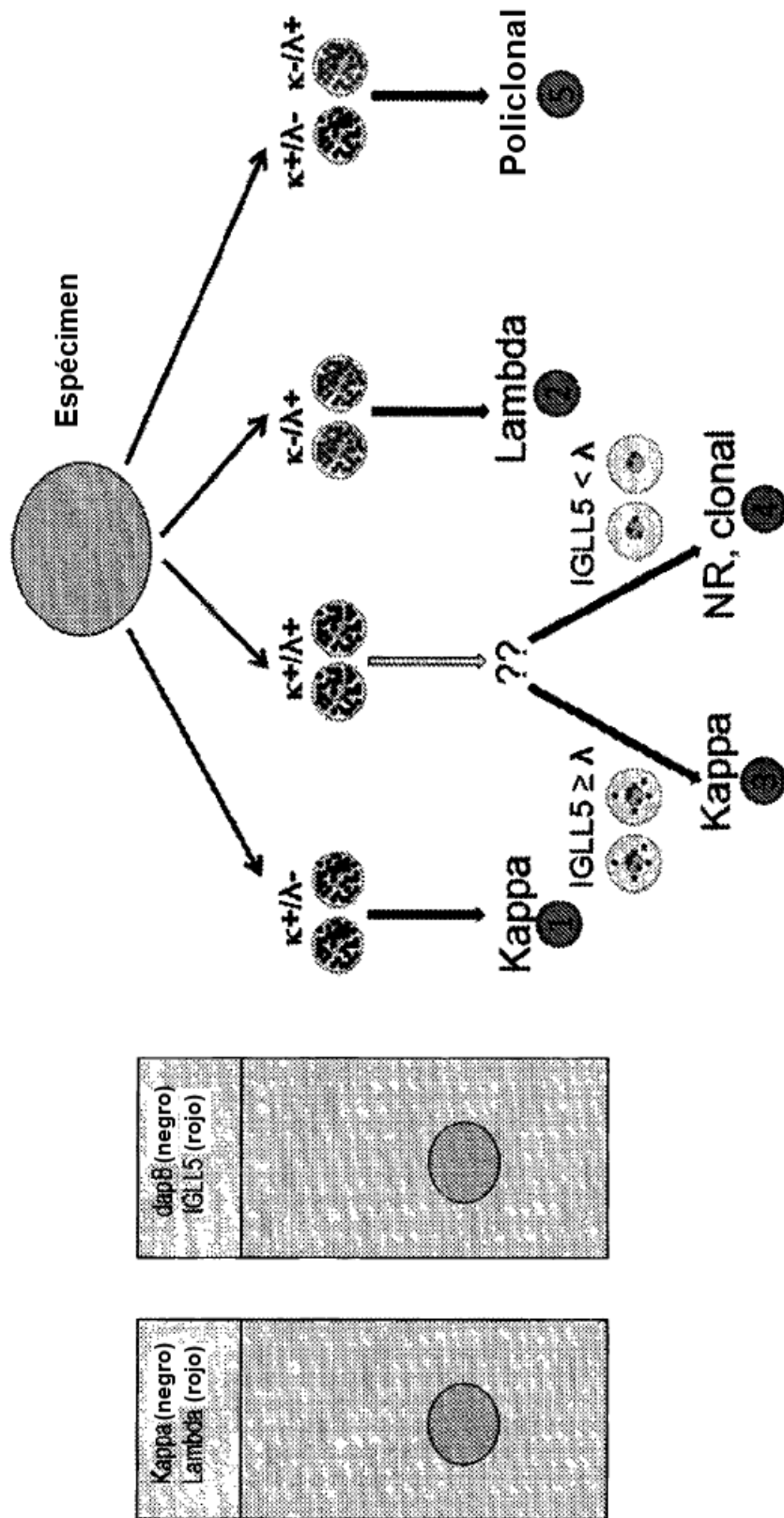


Fig. 8

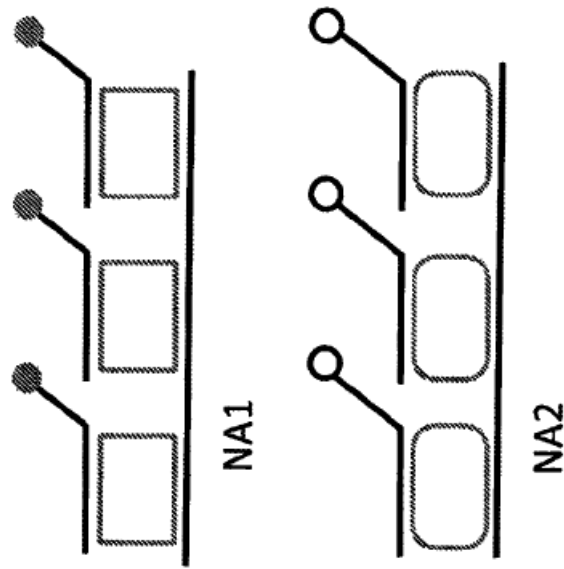


Figura 9B

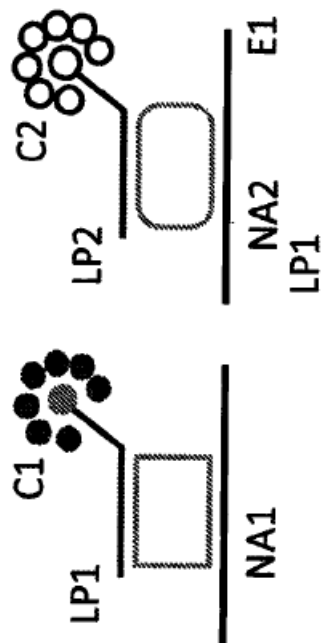


Figura 9A

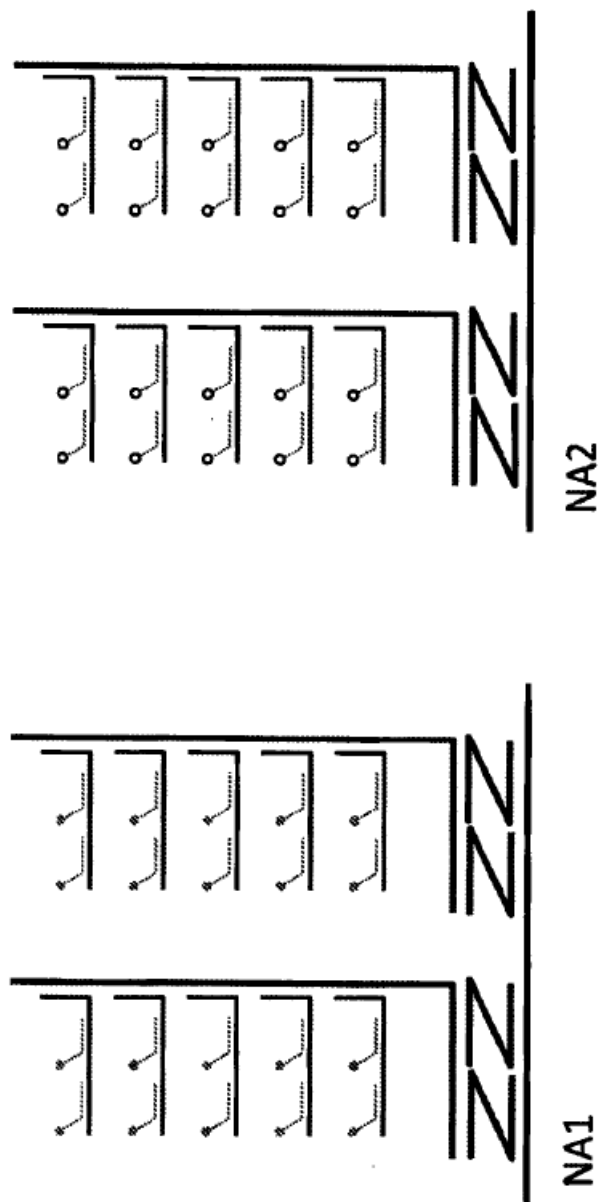


Figura 9C