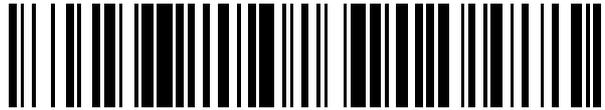


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 761**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2012 PCT/US2012/023411**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106385**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 12741485 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2670863**

54 Título: **Métodos de identificación de múltiples epítomos en células**

30 Prioridad:

31.01.2011 US 201161437854 P
17.02.2011 US 201161444067 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

NOLAN, GARRY, P.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 761 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de identificación de múltiples epítomos en células

Antecedentes de la invención

5 Aunque todas las células en el cuerpo humano contienen el mismo material genético, los mismos genes no están activos en todas las células. Las alteraciones en los patrones de expresión génica pueden tener efectos profundos sobre las funciones biológicas. Además, comprender la dinámica y la regulación de los productos génicos (proteínas), sus variantes y parejas interaccionantes es esencial para comprender, por ejemplo, los mecanismos que subyacen a los trastornos genéticos/e inducidos ambientalmente o a las influencias de las terapias mediadas por fármacos. Esta comprensión puede llegar a ser potencialmente la base subyacente para más análisis clínicos y de diagnóstico. Por tanto, identificar y cuantificar la expresión y regulación de los genes y/o sus productos en las células puede ayudar al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y de diagnóstico.

15 Es fundamental para estos estudios la capacidad de determinar cualitativamente la expresión génica y las variantes específicas de proteínas completas (por ejemplo, variantes por empalme, mutaciones puntuales, versiones modificadas postraduccionalmente y modificaciones inducidas ambientalmente/terapéuticamente) y la capacidad de ver su modulación cuantitativa. Por otra parte, cada vez es más importante realizar estos análisis a partir no solo de una, sino de múltiples moléculas diana en una célula. Los métodos disponibles hasta la fecha todavía requieren cantidades significativas de muestras biológicas o no proporcionarán información específica de la célula. Además, existen métodos limitados de tecnologías multiplexadas de medición de proteínas debido a los retos adicionales inherentes a las muestras de proteínas.

20 Por tanto, existe una necesidad de detección, identificación y cuantificación precisas y sensibles de moléculas diana en cada célula de una población compleja de células y de retención de la información específica de las células con respecto a dicha molécula diana. Nam, *et al.*, describen bio-códigos de barras basados en nanopartículas para la detección ultrasensible de proteínas (*Science* (2003) Vol. 301, pages 1884 - 1886. Fredriksson, *et al.*, describen la detección de proteínas usando ensayos de ligación de DNA dependientes de proximidad (*Nature Biotechnology*, Vol. 20, pages 473 - 477). Lipshutz, documento US2003219801, describe una técnica basada en aptámeros para la identificación de ligandos.

Sumario de la invención

30 La invención se refiere en general al campo de la detección, identificación y cuantificación de moléculas diana en una muestra. La presente invención se refiere en parte a la detección, identificación y cuantificación de moléculas diana individuales en células únicas de una población celular compleja mientras se retiene información específica de las células con respecto a dicha molécula diana.

35 En particular, la presente invención proporciona un método para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra que comprende una pluralidad de células, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir a las moléculas diana en la pluralidad de células una pluralidad de etiquetas, en donde una etiqueta comprende un agente de unión única (abreviadamente UBA, por sus iniciales en inglés *Unique Binding Agent*) que es específico para una de las moléculas diana y un código de barras específico del epítipo (abreviadamente ESB, por sus iniciales en inglés *Epitope Specific Barcode*) que comprende un código que representa la identidad de la molécula diana; y (b) añadir posteriormente múltiples subunidades polímeras analizables (abreviadamente APS, por sus iniciales en inglés *Assayable Polymer Subunits*) a cada una de las etiquetas unidas en la pluralidad de células de manera ordenada durante rondas sucesivas de síntesis por agrupamiento y división para crear códigos de barras de origen de la célula (abreviadamente COB, por sus iniciales en inglés *Cell Origination Barcodes*) únicos que representan las identidades de células individuales a las que están unidas las etiquetas.

40 La presente invención también proporciona una composición que comprende un complejo entre: a) una molécula diana; b) un agente de unión única (UBA) que es específico para la molécula diana; c) un código de barras específico del epítipo (ESB) dependiente del UBA y d) un código de barras de origen de la célula (COB) que comprende una pluralidad de subunidades polímeras analizables (APS) ordenadas, en donde es detectable el orden de las APS.

45 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para identificar si una pluralidad de dianas está en una pluralidad de células que comprenden: unir a las dianas una pluralidad de etiquetas, en donde una etiqueta comprende un código que representa a) la identidad de la diana y b) la identidad de la célula a la que se une la etiqueta. En algunas realizaciones, la separación o aislamiento de las células individuales no es necesario para la etapa de unión. En algunas realizaciones, las etiquetas comprenden bloques constitutivos que están asociados directa o indirectamente entre sí, por ejemplo por medio de un enlace covalente o por asociación por afinidad. En algunas realizaciones, las etiquetas se forman por polimerización in situ de bloques constitutivos. En algunas realizaciones, se añaden múltiples bloques constitutivos en una etapa. En alguna realización, se añade un solo bloque constitutivo en cada etapa. En algunas realizaciones, la célula está viva. En algunas realizaciones, la célula está lisada o fijada.

50 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para identificar una única célula asociada a una diana que comprende: unir a la diana una etiqueta, en donde la etiqueta comprende un código que representa a) la diana y

b) la única célula; en donde durante la unión la única célula no está aislada de una población de células, y en donde el código que representa la única célula se desconoce antes de la unión.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para identificar una única célula asociada con una diana que comprende: unir a la diana una etiqueta, en donde la etiqueta comprende un código que representa a) la diana y b) la única célula; en donde durante la unión la única célula está aislada de una población de células, y en donde el código que representa la única célula se desconoce antes de la unión.

En algunas realizaciones, la descripción comprende además detectar el código, en donde no es necesario la separación o el aislamiento de una célula individual para la etapa de detección. En algunas realizaciones, cada diana es una proteína o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la etiqueta es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas realizaciones, la etiqueta comprende una serie de subunidades monoméricas que comprenden un código descifrado. En algunas realizaciones, la etiqueta es un constituyente molecular codificado que se puede descodificar. En algunas realizaciones, la etiqueta comprende una combinación de partes que se pueden descodificar para determinar la naturaleza de la etiqueta.

En algunas realizaciones, la etiqueta comprende un UBA. En algunas realizaciones, el UBA es específico para una de las dianas. En algunas realizaciones, la etiqueta comprende un UBA. En algunas realizaciones, el UBA comprende un anticuerpo. En algunas realizaciones, la etiqueta comprende un ESB. En algunas realizaciones, el ESB comprende un enlazador común (abreviadamente CL, por sus siglas en inglés *Common Linker*). En algunas realizaciones, el ESB codifica la identidad de la diana. En algunas realizaciones, el ESB comprende un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la etiqueta comprende una APS. En algunas realizaciones, la APS es detectable como una unidad de codificación detectablemente distinta. En algunas realizaciones, durante la etapa de unión se añaden a la etiqueta múltiples APS de una manera ordenada durante rondas sucesivas de síntesis por agrupamientos y división. En algunas realizaciones, la etiqueta comprende al menos 10 APS. En algunas realizaciones, la APS comprende un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la etiqueta comprende múltiples APS, un ESB y un UBA unidos por ligación. En algunas realizaciones, múltiples APS, el ESB y/o el UBA se pueden unir por *química clic*. En algunas realizaciones, la APS o el ESB comprenden una región de unión al cebador de amplificación. En algunas realizaciones, el UBA, el ESB o la APS son moldeables. En alguna realización, el UBA, el ESB o la APS son de un constituyente diferente discernible (GPN: lo que significa que una parte del código puede ser un ácido nucleico, otra puede ser un polipéptido, otra puede ser una molécula pequeña, etc.).

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a composiciones que comprenden: a) una primera molécula diana, b) un primer agente de unión única (UBA) específico para la primera molécula diana, c) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) dependiente del UBA enlazable y d) una pluralidad de subunidades polímeras analizables (APS) ordenadas, en donde el orden de las APS es detectable. En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un oligopéptido, una proteína, una fosfoproteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, una molécula pequeña sintética, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido, un polisacárido, un lípido, un esteroide y un fosfolípido.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a composiciones que comprenden una población de partículas, comprendiendo cada una al menos una primera molécula diana, donde la primera molécula diana está asociada con: a) un primer agente de unión única (UBA) específico para la primera molécula diana, b) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) dependiente del UBA y c) una primera pluralidad de subunidades polímeras analizables (APS) ordenadas, en donde la pluralidad de las APS ordenadas asociadas con la primera molécula diana de una primera partícula en la población es detectablemente diferente que la pluralidad de las APS ordenadas asociadas a la primera molécula diana de una segunda partícula en la población.

En algunas realizaciones, la pluralidad de las APS ordenadas comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 APS. En algunas realizaciones, la pluralidad de las APS ordenadas comprende más de 20 APS. En algunas realizaciones, las APS son moldeables. En algunas realizaciones, al menos una partícula discreta se selecciona del grupo que consiste en una célula, un liposoma, un orgánulo, una micela, una gota y una perla. En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un oligopéptido, una proteína, una fosfoproteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, una molécula pequeña sintética, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido, un polisacárido, un lípido, un esteroide y un fosfolípido. En algunas realizaciones, el primer ESB comprende un primer enlazador común (CL). En algunas realizaciones, dicha primera molécula diana está unida directamente a dicho primer UBA y dicho primer ESB está unido directamente a dicho primer UBA. En algunas realizaciones, la pluralidad de APS ordenadas se forma por adición escalonada de las APS en rondas separadas. En algunas realizaciones, la APS añadida en cada ronda se une al primer complejo. En algunas realizaciones, el enlace es por orden de rondas. En algunas realizaciones, el enlace se realiza por la afinidad de unión. En algunas realizaciones, el enlace de una APS, un ESB o un UBA se realiza usando métodos químicos. En algunas realizaciones, el método químico comprende *química clic*. En algunas realizaciones, el enlace se realiza en presencia de Cu^I. En algunas realizaciones, un UBA, una APS o un ESB comprenden ácidos nucleicos. Algunas realizaciones comprenden además un primer oligonucleótido enlazador que comprende una primera y una segunda regiones complementarias de dos componentes seleccionados entre un UBA, una APS y un ESB. En algunas realizaciones, un UBA, una APS o un ESB se enlazan usando un oligonucleótido enlazador que comprende las regiones complementarias primera y segunda de dos componentes seleccionados de un UBA, una APS y un ESB. Algunas realizaciones comprenden además un segundo

oligonucleótido enlazador que comprende una tercera y una cuarta regiones complementarias de dos componentes seleccionados entre un UBA, una APS y un ESB. En algunas realizaciones, un UBA, una APS o un ESB se enlazan usando un oligonucleótido enlazador que comprende las regiones complementarias tercera y cuarta de dos componentes seleccionados de un UBA, una APS y un ESB. En algunas realizaciones, las regiones complementarias segunda y cuarta son idénticas. En algunas realizaciones, las regiones complementarias segunda y cuarta son idénticas. En algunas realizaciones, la región complementarias primera o segunda está compartida entre dos APS dentro de la pluralidad de las APS. En algunas realizaciones, el enlace se realiza por ligación. En algunas realizaciones, el oligonucleótido enlazador comprende un subcódigo que codifica el origen de la APS o del ESB. En algunas realizaciones, la APS tiene un subcódigo que codifica el origen de la APS. En algunas realizaciones, el ESB tiene un subcódigo que codifica el origen del ESB. En algunas realizaciones, una molécula individual de APS, de ESB o de oligonucleótido enlazador comprende una etiqueta contadora única. En algunas realizaciones, la etiqueta contadora única es detectable. En algunas realizaciones, el ESB se enlaza covalentemente al oligonucleótido enlazador. En algunas realizaciones, una APS o un ESB comprenden una región de unión al cebador de amplificación. En algunas realizaciones, las APS y el ESB, cuando están enlazados, son capaces de codificar un producto secundario. En algunas realizaciones, el producto secundario es un RNA o un péptido. En algunas realizaciones, las APS y el ESB, cuando están enlazados, comprenden un sitio de iniciación de polimerasa. En algunas realizaciones, el péptido comprende una etiqueta de afinidad. En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad es una etiqueta His. En algunas realizaciones, el UBA, el ESB o la APS son moldeables. En algunas realizaciones, la composición comprende además una sonda. En algunas realizaciones, la sonda está unida a una superficie. En algunas realizaciones, la superficie comprende una matriz. En algunas realizaciones, la superficie comprende una perla. En algunas realizaciones, el UBA se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, péptido, aptámero, peptoide y ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ESB se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, perlas y subunidades químicas. En algunas realizaciones, dicha APS comprende un ácido nucleico, una molécula pequeña o moléculas complejas construibles de peso determinista.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a kits para marcar una molécula diana de una célula en una población de células con un código de barras de origen de la célula, que comprende a) n conjuntos de m subunidades polímeras analizables (APS), comprendiendo cada una un paquete de información distinto; en donde los paquetes de información se pueden enlazar de una manera ordenada; b) un agente de unión única (UBA) específico de una molécula diana.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a kits para marcar una molécula diana de una célula en una población de células con un código de barras de origen de la célula, que comprende a) n conjuntos de m subunidades polímeras analizables (APS), comprendiendo cada una un paquete de información distinto; en donde los paquetes de información se pueden enlazar de una manera ordenada; b) una pluralidad de agentes de unión única (UBA) específicos de una molécula diana, enlazado cada uno a un código de barras específico del epítipo (ESB) específico de un UBA.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a kits para marcar una molécula diana de una célula en una población de células con un código de barras de origen de la célula, que comprende a) n conjuntos de m subunidades polímeras analizables (APS), comprendiendo cada una un paquete de información distinto; en donde los paquetes de información se pueden enlazar de una manera ordenada; b) una pluralidad de agentes de unión única (UBA) específicos de una molécula diana; c) una pluralidad de códigos de barras específicos del epítipo (ESB) específicos de un UBA, en donde cada ESB es capaz de enlazarse con un UBA diseñado.

En algunas realizaciones, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, m es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En algunas realizaciones, n es mayor que 10. En algunas realizaciones, m es mayor que 20. En algunas realizaciones, el primer ESB comprende un primer enlazador común (CL). En algunas realizaciones, dicho ESB es capaz de unirse directamente a dicho UBA. En algunas realizaciones, dicho UBA es capaz de unirse directamente a la molécula diana. En algunas realizaciones, al menos dos de los conjuntos de subunidades polímeras analizables (APS) son idénticos. En algunas realizaciones, las APS de un primer conjunto es enlazable a las APS de un segundo conjunto. En algunas realizaciones, las APS de un primer conjunto son además enlazables a las APS de un segundo conjunto de una manera ordenada. En algunas realizaciones, una APS, un ESB o un UBA se pueden enlazar usando métodos químicos. En algunas realizaciones, el método químico comprende *química clic*. En algunas realizaciones, se requiere la presencia de Cu^I para el enlace. En algunas realizaciones, los componentes del kit pueden ensamblarse mediante unión por afinidad. En algunas realizaciones, un UBA, una APS o un ESB comprenden ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los kits comprenden además un primer oligonucleótido enlazador que comprende una primera y una segunda regiones complementarias de dos componentes seleccionados de un UBA, una APS y un ESB. En algunas realizaciones, los kits comprenden además un segundo oligonucleótido enlazador que comprende una tercera y una cuarta regiones complementarias de dos componentes seleccionados de un UBA, una APS y un ESB. En algunas realizaciones, las regiones complementarias primera y tercera son idénticas. En algunas realizaciones, las regiones complementarias segunda y cuarta son idénticas. En algunas realizaciones, una APS, un ESB o un UBA pueden ser enlazados por ligación. En algunas realizaciones, el oligonucleótido enlazador comprende un subcódigo que codifica el conjunto original de la APS o el ESB. En algunas realizaciones, la APS tiene un subcódigo que codifica la población de origen de la APS. En algunas realizaciones, el ESB tiene un subcódigo que codifica la población de origen del ESB. En algunas realizaciones, una molécula individual de APS, de ESB o de oligonucleótido enlazador comprende una etiqueta

contadora única. En algunas realizaciones, la etiqueta contadora única es detectable. En algunas realizaciones, el ESB se enlaza covalentemente al oligonucleótido enlazador. En algunas realizaciones, una APS o un ESB comprende una región de unión al cebador de amplificación. En algunas realizaciones, las APS y el ESB, cuando están enlazados, pueden codificar un producto secundario. En algunas realizaciones, el producto secundario es un RNA o un péptido. En algunas realizaciones, las APS y el ESB, cuando están enlazados, comprenden un sitio de iniciación de polimerasa. En algunas realizaciones, el péptido comprende una etiqueta de afinidad. En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad es una etiqueta His. En algunas realizaciones, el UBA, el ESB o la APS son moldeables. En algunas realizaciones, el kit comprende además una sonda. En algunas realizaciones, la sonda está unida a una superficie. En algunas realizaciones, la superficie comprende una matriz. En algunas realizaciones, la superficie comprende una perla. En algunas realizaciones, la pluralidad de los UBA comprende 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más de 1000 UBA. En algunas realizaciones, la pluralidad de UBA comprende hasta 2000 UBA. En algunas realizaciones, el UBA se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, péptido, aptámero, peptido y ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ESB se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, perlas y subunidades químicas. En algunas realizaciones, dicha APS comprende un ácido nucleico, una molécula pequeña o moléculas complejas construibles de peso determinista.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para identificar moléculas diana que comparten un origen de partícula común, que comprende marcar una primera pluralidad de dianas de una primera partícula en una población de x partículas con un primer código de barras de origen; y marcar una segunda pluralidad de dianas de una segunda partícula en una población de x partículas con un segundo código de barras de origen; en donde cada código de barras de origen comprende un conjunto de n subunidades polímeras analizables (APS); en donde cada una de las n APS en el primer y segundo conjunto de las APS se selecciona de un grupo que comprende m APS diferentes; y en donde los primer y segundo códigos de barras de origen son detectablemente diferentes entre sí con una certeza de $c = 1 - [(1 - 1/x)^{(m^n)}]$. En algunas realizaciones, x es mayor que 1.000.000. En algunas realizaciones, c es mayor que 99,9%. En algunas realizaciones, c es mayor que 99,99%. En algunas realizaciones, c es mayor que 99,999%. En algunas realizaciones, c es mayor que 99,9999%. En algunas realizaciones, c es mayor que 99,99999%. En algunas realizaciones, n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, m es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En algunas realizaciones, n es mayor que 10. En algunas realizaciones, m es mayor que 20.

En algunas realizaciones, al menos una partícula discreta se selecciona del grupo que consiste en una célula, un liposoma, un orgánulo, una micela, una gota y una perla. En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un oligopéptido, una proteína, una fosfoproteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, una molécula pequeña sintética, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido, un polisacárido, un lípido, un esteroide y un fosfolípido. En algunas realizaciones, al menos dos grupos que comprenden m APS diferentes son idénticos.

En algunas realizaciones, se añaden n APS en rondas separadas. En algunas realizaciones, se enlazan APS de rondas separadas. En algunas realizaciones, el enlace es por orden de rondas. En algunas realizaciones, se selecciona un n y/o m apropiado basándose en un nivel de certeza deseado dado un número de células, x .

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para impartir un código específico de una partícula a un componente de una partícula de una población de partículas, comprendiendo el método: enlazar un primer conjunto ordenado de subunidades polímeras analizables (APS) con un primer componente de una primera partícula de una población de partículas, en donde es detectable el orden de las APS. En algunas realizaciones, el método comprende además detectar el primer conjunto ordenado de las APS enlazadas con el primer componente, determinando de este modo un origen de la partícula del primer componente. En algunas realizaciones, el método comprende además enlazar un segundo conjunto ordenado de subunidades polímeras analizables (APS) con un segundo componente de la primera partícula de una población de partículas, en donde es detectable el orden de las APS. En algunas realizaciones, el método comprende además detectar el segundo conjunto ordenado de las APS enlazadas con el segundo componente, determinando de este modo el origen de la partícula del segundo componente. En algunas realizaciones, los conjuntos primero y segundo ordenados de las APS enlazadas con los componentes primero y segundo de la primera partícula son los mismos. En algunas realizaciones, el método comprende además enlazar un tercer conjunto ordenado de subunidades polímeras analizables (APS) con un primer componente de una segunda partícula de una población de partículas, en donde es detectable el orden de las APS. En algunas realizaciones, el primer conjunto ordenado de las APS enlazadas con el primer componente de la primera partícula es diferente del tercer conjunto ordenado de subunidades polímeras analizables enlazadas con el primer componente de la segunda partícula. En algunas realizaciones, el método comprende además enlazar un código de barras específico del epítipo (ESB) específico de un componente con el primer componente. En algunas realizaciones, el método comprende además enlazar un ESB específico de un componente con el segundo componente. En algunas realizaciones, al menos la partícula se selecciona del grupo que consiste en una célula, un liposoma, un orgánulo, una micela, una gota y una perla. En algunas realizaciones, dicha al menos una molécula diana se une directamente a dicho primer UBA y dicho ESB se une directamente a dicho UBA. En algunas realizaciones, al menos dos de los conjuntos de subunidades polímeras analizables (APS) son idénticos. En algunas realizaciones, cada APS del conjunto ordenado de las APS está enlazado con el primer complejo. En algunas realizaciones, el enlace es por orden de rondas. En algunas realizaciones, el UBA, el ESB o la APS codifica un producto secundario. En algunas realizaciones, el producto secundario es un RNA o un péptido. En algunas

realizaciones, el UBA, el ESB o la APS son moldeables. En algunas realizaciones, el ESB comprende además una etiqueta contadora única. En algunas realizaciones, la cantidad de la molécula diana de la molécula se estima usando la etiqueta contadora. En algunas realizaciones, la APS comprende además un subcódigo específico de ronda. En algunas realizaciones, la detección comprende además determinar la presencia de una APS a partir de una ronda designada. En algunas realizaciones, la detección es digital. En algunas realizaciones, la detección es indirecta. En algunas realizaciones, la detección comprende espectrometría de masas. En algunas realizaciones, la detección comprende secuenciación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la detección comprende secuenciación de péptidos. En algunas realizaciones, la detección comprende electroforesis en gel. En algunas realizaciones, la detección comprende HPLC u otra separación cromatográfica. En algunas realizaciones, la detección comprende detectar una o más señales asociadas con una o más APS individuales. En algunas realizaciones, las señales están ordenadas. En algunas realizaciones, la detección comprende usar una o más sondas. En algunas realizaciones, la sonda está unida a una superficie. En algunas realizaciones, la superficie comprende una matriz. En algunas realizaciones, la superficie comprende una perla. En algunas realizaciones, la detección comprende una separación. En algunas realizaciones, la separación es multidimensional. En algunas realizaciones, la separación resuelve el primer código de barras específico del epítipo (ESB) dependiente de UBA a partir de un segundo código de barras específico del epítipo (ESB) enlazable dependiente de UBA. En algunas realizaciones, se detectan 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más de 1000 moléculas diana diferentes. En algunas realizaciones, se detectan hasta 2000 moléculas diana diferentes. En algunas realizaciones, el UBA se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, péptido, aptámero, peptido y ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ESB se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, perlas y subunidades químicas. En algunas realizaciones, dicha APS comprende un ácido nucleico, una molécula pequeña o moléculas complejas construibles de peso determinista. En algunas realizaciones, las APS se enlazan por ligación o extensión mediante polimerización. En algunas realizaciones, se genera un código de barras del origen de la célula (COB) con las APS del conjunto ordenado de las APS. En algunas realizaciones, cada COB en dicha pluralidad de complejos tiene una señal o secuencia detectable que lo distingue de otros COB en dicha población de células. En algunas realizaciones, una APS, un ESB o un UBA se enlazan usando métodos químicos. En algunas realizaciones, el método químico comprende *química clic*. En algunas realizaciones, el enlace se realiza en presencia de Cu^I. En algunas realizaciones, un UBA, una APS o un ESB comprenden ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el enlace de un UBA, una APS o un ESB se realiza usando un oligonucleótido enlazador que comprende una primera y una segunda regiones complementarias de dos componentes que se han de enlazar. En algunas realizaciones, la región complementaria primera o segunda es compartida entre las APS dentro de una población de APS. En algunas realizaciones, la región complementaria primera o segunda es distinta para dos conjuntos diferentes de APS específicas de rondas. En algunas realizaciones, el método comprende además una ligación. En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un oligopéptido, una proteína, una fosfoproteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, una molécula pequeña sintética, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido, un polisacárido, un lípido, un esteroide y un fosfolípido. En algunas realizaciones, el primer ESB comprende un primer enlazador común (CL). En algunas realizaciones, el primer ESB comprende un primer enlazador común (CL). En algunas realizaciones, una molécula de APS, de ESB o de oligonucleótido enlazador individual comprende una etiqueta contadora única. En algunas realizaciones, la detección comprende detectar la etiqueta contadora única. En algunas realizaciones, se determina el número de etiquetas contadoras únicas asociadas con un ESB específico. En algunas realizaciones, el número de etiquetas contadoras únicas detectadas se relaciona con la cantidad inicial del ESB específico. En algunas realizaciones, el ESB está enlazado covalentemente al oligonucleótido enlazador. En algunas realizaciones, una APS o un ESB comprenden una región de unión al cebador de amplificación. En algunas realizaciones, un COB codifica una secuencia peptídica. En algunas realizaciones, el COB comprende un sitio de iniciación de polimerasa. En algunas realizaciones, el péptido comprende una etiqueta de afinidad. En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad es una etiqueta His.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para detectar una pluralidad de propiedades que se originan en una pluralidad de partículas discretas, comprendiendo el método: a) proporcionar: i) una población de partículas que comprende al menos una primera molécula diana; ii) un primer agente de unión única (UBA) específico para la primera molécula diana; iii) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) enlazable dependiente de UBA; iv) una pluralidad de conjuntos de subunidades polímeras analizables (APS) específicas de rondas, conteniendo cada conjunto una pluralidad de las APS que son detectablemente distintas entre sí; b) formar al menos un primer complejo que comprende dicha al menos primera molécula diana, dicha primera sonda UBA y dicho primer ESB; c) realizar n rondas de síntesis por agrupamientos y división, comprendiendo cada ronda: i) dividir la población de partículas en m volúmenes de reacción; ii) poner en contacto uno o más volúmenes de reacción con una APS del conjunto de APS específico de la ronda; iii) agrupar dos o más volúmenes de reacción; d) detectar una pluralidad de propiedades de al menos una partícula de la población de partículas; donde al menos una de las propiedades está relacionada con una cantidad o una identidad para una molécula diana asociada con la partícula.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para detectar una pluralidad de propiedades que se originan a partir de una pluralidad de partículas discretas, comprendiendo el método: a) proporcionar: i) una población de partículas que comprende al menos una primera molécula diana; ii) un primer agente de unión única (UBA) específico de la primera molécula diana; iii) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) enlazable dependiente de UBA; y iv) una pluralidad de conjuntos de subunidades polímeras analizables (APS) específicas de rondas, conteniendo cada conjunto una pluralidad de las APS que son detectablemente distintas entre sí; b) formar

al menos un primer complejo que comprende dicha al menos primera molécula diana, dicha primera sonda UBA y dicho primer ESB; c) realizar n rondas de síntesis por agrupamientos y división, comprendiendo cada ronda: i) dividir la población de partículas en m volúmenes de reacción; ii) poner en contacto uno o más volúmenes de reacción con una APS del conjunto de APS específica de la ronda; y iii) agrupar dos o más volúmenes de reacción; d) realizar otra ronda de síntesis por agrupamiento y división que comprende las etapas c) i) y c) ii); e) detectar una pluralidad de propiedades de al menos una partícula de la población de partículas; donde al menos una de las propiedades está relacionada con una cantidad o una identidad para una molécula diana asociada con la partícula.

En algunas realizaciones, el método de agrupamiento y división se reemplaza por separación de partículas, por ejemplo en micropocillos, o en dispositivos para microfluidos. En algunas realizaciones, las células separadas se marcan con códigos de barras del origen de la célula. En algunas realizaciones, los códigos de barras del origen de la célula se construyen in situ por adición escalonada de bloques constitutivos.

En algunas realizaciones, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En algunas realizaciones, n es más de 20. En algunas realizaciones, m es diferente entre al menos dos rondas. En algunas realizaciones, m es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En algunas realizaciones, m es más de 20. En algunas realizaciones, se selecciona al menos una partícula discreta del grupo que consiste en una célula, un liposoma, un orgánulo, una micela, una gota y una perla. En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un oligopéptido, una proteína, una fosfoproteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, una molécula pequeña sintética, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido, un polisacárido, un lípido, un esteroide y un fosfolípido. En algunas realizaciones, el primer ESB comprende un primer enlazador común (CL). En algunas realizaciones, dicha al menos una molécula diana se une directamente a dicho primer UBA y dicho ESB se une directamente a dicho UBA. En algunas realizaciones, al menos dos de los conjuntos de subunidades polímeras analizables (APS) son idénticos. En algunas realizaciones, la APS añadida en cada ronda se enlaza al primer complejo. En algunas realizaciones, el enlace es por orden de rondas. En algunas realizaciones, el UBA, el ESB o la APS codifican un producto secundario. En algunas realizaciones, el producto secundario es un RNA o un péptido. En algunas realizaciones, el UBA, el ESB o la APS son moldeables. En algunas realizaciones, el ESB comprende además una etiqueta contadora única. En algunas realizaciones, la cantidad de la molécula diana de la molécula se estima usando la etiqueta contadora. En algunas realizaciones, la APS comprende además un subcódigo específico de ronda. En algunas realizaciones, la detección comprende además determinar la presencia de una APS a partir de una ronda designada. En algunas realizaciones, la detección es digital. En algunas realizaciones, la detección es indirecta. En algunas realizaciones, la detección comprende espectrometría de masas. En algunas realizaciones, la detección comprende secuenciación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la detección comprende secuenciación de péptidos. En algunas realizaciones, la detección comprende detectar una o más señales asociadas con una o más APS individuales. En algunas realizaciones, las señales están ordenadas. En algunas realizaciones, la detección comprende usar una o más sondas. En algunas realizaciones, la sonda está unida a una superficie. En algunas realizaciones, la superficie comprende una matriz. En algunas realizaciones, la superficie comprende una perla. En algunas realizaciones, la detección comprende una separación. En algunas realizaciones, la separación es multidimensional. En algunas realizaciones, la separación resuelve el primer código de barras específico del epítipo (ESB) enlazable dependiente de UBA a partir de un segundo código de barras específico del epítipo (ESB) enlazable dependiente de UBA. En algunas realizaciones, se detectan 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más de 1000 moléculas diana diferentes. En algunas realizaciones, se detectan hasta 2000 moléculas diana diferentes. En algunas realizaciones, el UBA se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, péptido, aptámero, peptido y ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ESB se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, perlas y subunidades químicas. En algunas realizaciones, dicha APS comprende un ácido nucleico, una molécula pequeña o moléculas complejas construibles de peso determinista. En algunas realizaciones, las APS se enlazan por ligación o extensión mediante polimerización. En algunas realizaciones, se genera un código de barras del origen de la célula (COB) a partir de las APS de los conjuntos de APS específicas de rondas. En algunas realizaciones, cada COB en dicha pluralidad de complejos tiene una señal o secuencia detectable que lo distingue de otros COB en dicha población de células. En algunas realizaciones, una APS, un ESB o un UBA se enlazan usando métodos químicos. En algunas realizaciones, el método químico comprende *química clic*. En algunas realizaciones, el enlace se realiza en presencia de Cu^I . En algunas realizaciones, un UBA, una APS o un ESB comprende ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el enlace de un UBA, una APS o un ESB se realiza usando un oligonucleótido enlazador que comprende una primera y una segunda regiones complementarias de dos componentes que se han de enlazar. En algunas realizaciones, la región complementaria primera o segunda es compartida entre las APS dentro de una población de APS. En algunas realizaciones, las regiones complementarias primera o segunda son distintas para dos conjuntos diferentes de APS específicas de rondas. Algunas realizaciones comprenden además una ligación. En algunas realizaciones, el oligonucleótido enlazador comprende un subcódigo que codifica la población origen de la APS o del ESB. En algunas realizaciones, la APS tiene un subcódigo que codifica el conjunto específico de rondas de la APS. En algunas realizaciones, el ESB tiene un subcódigo que codifica la presencia origen del ESB. En algunas realizaciones, una molécula individual de APS, de ESB o de oligonucleótido enlazador comprende una etiqueta contadora única. En algunas realizaciones, la detección comprende detectar la etiqueta contadora única. En algunas realizaciones, se determina el número de etiquetas contadoras únicas asociadas con un ESB específico. En algunas realizaciones, el número de etiquetas contadoras únicas detectadas está relacionada con la cantidad inicial del ESB específico. En algunas realizaciones, el ESB se enlaza covalentemente al oligonucleótido enlazador. En algunas realizaciones, una APS o un ESB comprende una región de unión al cebador de amplificación. En algunas

realizaciones, un COB codifica una secuencia peptídica. En algunas realizaciones, el COB comprende un sitio de iniciación de polimerasa. En algunas realizaciones, el péptido comprende una etiqueta de afinidad. En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad es una etiqueta His. En algunas realizaciones, cada uno de los volúmenes de reacción creados por la división más reciente recibe una APS diferente del conjunto de APS.

5 En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para detectar al menos una molécula diana en una muestra que comprende las etapas: (a) proporcionar: (i) una población de células que comprende potencialmente al menos una molécula diana, (ii) un primer UBA específico para una primera molécula diana, (iii) un primer código de barras específico del epítipo ESB específico para una región del primer UBA, donde el ESB comprende un primer resto enlazador común, y (iv) una población de COB, donde la población de COB comprende un segundo resto enlazador común, donde el segundo resto enlazador es complementario del primer resto enlazador común en el primer ESB; (b) formar al menos un primer complejo que comprende al menos una molécula diana, la primera sonda UBA y el primer ESB, donde la al menos una molécula diana está unida al primer UBA y el ESB se une al UBA; (c) añadir la población de los COB, donde se forma un segundo complejo con al menos una molécula diana, la primera sonda UBA, el primer ESB y un primer COB, y donde el segundo resto enlazador común del primer COB está unido al primer resto enlazador del primer ESB, y donde los COB de la población de COB se asocian con una célula de la población de células; y (d) detectar el segundo complejo o al menos parte del tercer complejo.

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para detectar al menos una molécula diana en una muestra que comprende las etapas: (a) proporcionar: (i) una población de células que comprende potencialmente al menos una molécula diana, (ii) un primer agente de unión única (UBA) específico para una primera molécula diana, (iii) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) específico para una región del primer UBA, donde el ESB comprende un primer resto enlazador común y (iv) una población de subunidades polímeras analizables (APS), donde las APS comprenden un segundo resto enlazador común y un tercer resto enlazador común, donde el segundo resto enlazador es complementario del primer resto enlazador común en el primer ESB; (b) formar al menos un primer complejo que comprende al menos una molécula diana, la primera sonda UBA y el primer ESB, donde la al menos una molécula diana está unida al primer UBA y el ESB está unido al UBA; (c) dividir la población en dos o más muestras; (d) añadir una APS de la población de APS por muestra a las dos o más muestras de la etapa (c), donde se forma un segundo complejo con al menos una molécula diana, la primera sonda UBA, el primer ESB y una primera APS, y donde el segundo resto enlazador común de la primera APS está unido al primer resto enlazador del primer ESB; (e) agrupar las dos o más muestras de la etapa (c) en una muestra; (f) dividir la muestra de la etapa (e) en dos o más muestras; (g) añadir una APS de la población de APS por muestra a las dos o más muestras de la etapa (e), donde se forma un tercer complejo con al menos una molécula diana, la primera sonda UBA, el primer ESB, la primera APS y la segunda APS, donde el segundo resto enlazador común de la segunda APS está unido al tercer resto enlazador de la primera APS, y donde la primera APS y la segunda APS forman un código de barras del origen de la célula (COB); y (c) detectar el tercer complejo o al menos parte del tercer complejo.

35 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además repetir las etapas (e) a (g).

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la detección de una pluralidad de moléculas diana formando una pluralidad de complejos en la etapa (b), comprendiendo cada complejo: (i) al menos una molécula diana, (ii) un primer UBA y (iii) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) específico para una región del primer UBA, donde el ESB comprende un primer resto enlazador común, donde al menos una molécula diana está unida al primer UBA y el ESB está unido al UBA.

En algunas realizaciones, cada COB en la pluralidad de complejos tiene una señal detectable que lo distingue de otros COB en la población de células.

En algunas realizaciones, el complejo se detecta por secuenciación o espectrometría de masas. En algunas realizaciones, el tercer complejo se detecta por un método que comprende contar individualmente la presencia de una o más moléculas del tercer complejo, donde la presencia de una o más moléculas del tercer complejo es indicativa de la concentración de la molécula diana en una célula. En algunas realizaciones, la detección individual comprende además detectar una señal digital.

En algunas realizaciones, se detectan 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más de 1000 moléculas diana diferentes. En algunas realizaciones, se detectan hasta 2000 moléculas diana diferentes.

50 En algunas realizaciones, el UBA se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, péptido, aptámero, peptido y ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ESB se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, perlas y subunidades químicas.

En algunas realizaciones, la APS es un ácido nucleico, una molécula pequeña o moléculas complejas construibles de peso determinista. En algunas realizaciones, la APS comprende un ácido nucleico monocatenario hibridado con una secuencia de polinucleótido complementaria que tiene unido a ella un marcador detectable.

En algunas realizaciones, la primera APS se une al primer ESB por ligación o extensión mediante polimerización. En algunas realizaciones, la segunda APS se une a la primera APS por ligación o extensión mediante polimerización.

En algunas realizaciones, el resto enlazador común es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ESB se une al USB.

En algunas realizaciones, dicho primer COB comprende una pluralidad de APS.

5 Algunas realizaciones, comprenden además la detección de una pluralidad de moléculas diana por un método que comprende: formar una pluralidad de complejos en la etapa (b), comprendiendo cada complejo (i) al menos una molécula diana, (ii) un primer UBA y (iii) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) específico para una región de dicho primer UBA, donde dicho ESB comprende un primer resto enlazador común, donde dicha al menos una molécula diana se asocia con dicho primer UBA y dicho ESB se asocia con dicho UBA.

En algunas realizaciones, cada COB en dicha pluralidad de complejos tiene una señal o secuencia detectable que lo distingue de otros COB en dicha población de células.

10 En algunas realizaciones, el enlace de una APS, un ESB o un UBA se realiza usando métodos químicos. En algunas realizaciones, el método químico comprende *química clic*. En algunas realizaciones, el enlace se realiza en presencia de Cu^I. En algunas realizaciones, el enlace de una APS, un ESB o un UBA se realiza usando afinidad de unión. En algunas realizaciones, un UBA, una APS o un ESB comprende ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el enlace de un UBA, una APS o un ESB se realiza usando un oligonucleótido enlazador que comprende una primera y una segunda regiones complementarias de dos componentes que se han de enlazar. En algunas realizaciones, la región complementaria primera o segunda es compartida entre las APS dentro de una población de APS. En algunas realizaciones, las regiones complementarias primera o segunda son distintas para diferentes poblaciones de APS. Algunas realizaciones comprenden además una ligación. En algunas realizaciones, el oligonucleótido enlazador comprende un subcódigo que codifica la población origen de la APS o del ESB. En algunas realizaciones, la APS tiene un subcódigo que codifica la población origen de la APS. En algunas realizaciones, el ESB tiene un subcódigo que codifica la población origen del ESB. En algunas realizaciones, una molécula individual de la APS, el ESB o el oligonucleótido enlazador comprende una etiqueta única. En algunas realizaciones, la detección comprende detectar la etiqueta única. En algunas realizaciones, se determina el número de etiquetas únicas asociadas con un ESB específico. En algunas realizaciones, el número de etiquetas únicas detectadas está relacionado con la cantidad inicial del ESB específico. En algunas realizaciones, el ESB se enlaza covalentemente al oligonucleótido enlazador. En algunas realizaciones, una APS o un ESB comprende una región de unión al cebador de amplificación. En algunas realizaciones, un COB codifica una secuencia peptídica. En algunas realizaciones, el COB comprende un sitio de iniciación de polimerasa. En algunas realizaciones, el péptido comprende una etiqueta de afinidad. En algunas realizaciones, la etiqueta de afinidad es una etiqueta His. En algunas realizaciones, las dos o más muestras comprenden al menos 5 muestras. En algunas realizaciones, las dos o más muestras comprenden al menos 10 muestras. En algunas realizaciones, las dos o más muestras comprenden al menos 20 muestras. En algunas realizaciones, cada una de las muestras creadas por la división más reciente recibe una APS diferente.

35 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos para marcar una molécula diana enlazada a ESB de una célula en una población de células con un código de barras de origen de la célula (COB), que comprende: separar cada célula en un volumen de reacción individual; y añadir el COB al ESB por medios químicos o de afinidad. En algunas realizaciones, el volumen de reacción se selecciona del grupo que consiste en una microburbuja, una microgota, un pocillo, un micropocillo y un recinto en un dispositivo para microfluidos.

40 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos que comprenden disociar una variedad de tipos de componentes que se originan en una célula y colocar los componentes sobre una partícula, en donde los componentes se marcan en dicha partícula. En algunas realizaciones, el marcaje comprende un marcaje de acuerdo con el origen de la célula. En algunas realizaciones, el marcaje comprende un marcaje de acuerdo con el tipo de componente.

45 En algunas realizaciones, las señales en las etapas de detección están ordenadas. En algunas realizaciones, la detección comprende usar una o más sondas. En algunas realizaciones, la sonda se une a una superficie. En algunas realizaciones, la superficie comprende una matriz. En algunas realizaciones, la superficie comprende una perla. En algunas realizaciones, la detección comprende una separación. En algunas realizaciones, la separación es multidimensional.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos para preparar al menos un UBA, un ESB y/o una APS como se describe en la presente memoria.

50 En algunas realizaciones, la descripción proporciona una población de varios UBA, ESB y/o APS como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la descripción proporciona kits que comprenden una población de varios UBA, ESB y APS como se describe en la presente memoria e instrucciones para su uso.

Breve descripción de los dibujos

55 Las características innovadoras de la invención se establecen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada, en la que se describen los principios de la invención, y los dibujos que se acompañan en los que:

La **Figura 1** representa una cantidad de información que representa una signature distinta (código de barras) del origen de la célula para cada epítipo.

La **Figura 2** muestra una representación gráfica de una realización de los componentes del código de barras específico del epítipo y de los códigos de barras de origen de las células de la invención y su ensamblaje.

La **Figura 3** muestra los reactivos UBA-ESB-CL de una realización de la invención.

La **Figura 4** representa el marcaje de células en una realización de la invención con reactivos UBA-ESB-CL.

5 La **Figura 5** representa los reactivos ESB-COB de una realización de la invención.

La **Figura 6** representa el ensamblaje de ESB-COB de acuerdo con una realización de la invención.

La **Figura 7** representa el ensamblaje de ESB-COB de acuerdo con otra realización de la invención.

La **Figura 8** representa el ensamblaje de ESB-COB de acuerdo con otra realización de la invención.

La **Figura 9** representa el ensamblaje de ESB-COB de acuerdo con otra realización de la invención.

10 La **Figura 10** representa el ensamblaje de ESB-COB de acuerdo con otra realización de la invención.

La **Figura 11** representa un péptido basado en la lectura de ESB-COB de acuerdo con una realización de la descripción.

Descripción detallada de la invención

15 El término “ácido nucleico” se refiere a un polímero de nucleótidos, y a menos que se limite de otra manera, incluye análogos conocidos de nucleótidos naturales que puedan actuar de manera similar (por ejemplo, hibridar) a nucleótidos de origen natural.

Los términos “polinucleótido”, “nucleótido”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o sus análogos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: regiones codificadoras o no codificadoras de un gen o fragmento de gen, DNA intergénico, loci (locus) definidos por análisis de enlazamiento, exones, intrones, RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia, RNA ribosómico, RNA pequeño de interferencia (siRNA), RNA pequeño en horquilla (shRNA), micro-RNA (miRNA), RNA pequeño nucleolar, ribozimas, DNA complementario (cDNA), que es una representación del DNA del mRNA, obtenido generalmente por transcripción inversa del RNA mensajero (mRNA) o por amplificación; moléculas de DNA producidas sintéticamente o por amplificación, DNA genómico, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, DNA aislado de cualquier secuencia, RNA aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones de la estructura de los nucleótidos se pueden realizar antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar además después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Las secuencias polinucleotídicas, cuando se proporcionan, se enumeran en la dirección 5' a 3', a menos que se indique lo contrario.

35 El término ácido nucleico abarca ácidos nucleicos bicatenarios o tricatenarios, así como moléculas monocatenarias. En los ácidos nucleicos bicatenarios o tricatenarios, las cadenas de ácido nucleico no necesitan ser coextensivas (es decir, un ácido nucleico bicatenario no es necesario que sea bicatenario a lo largo de toda la longitud de ambas cadenas).

40 El término ácido nucleico también abarca cualquiera de sus modificaciones químicas, tal como por metilación y/o protección de los extremos. Las modificaciones de los ácidos nucleicos pueden incluir la adición de grupos químicos que incorporan una carga adicional, polarizabilidad, unión por hidrógeno, interacción electrostática y funcionalidad para las bases de ácidos nucleicos individuales o para el ácido nucleico como un todo. Dichas modificaciones pueden incluir modificaciones de bases, tales como modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones de la pirimidina en la posición 5, modificaciones de la purina en la posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas de las citosinas, sustituciones del 5-bromo-uracilo, modificaciones de la cadena principal, combinaciones inusuales de pares de bases, tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares.

45 Más particularmente, en ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden incluir polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro tipo de ácido nucleico que sea un N- o C-glicósido de una base purínica o pirimidínica, así como otros polímeros que contienen cadenas principales de nucleótidos normales, por ejemplo, poliamida (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA)) y polímeros de polimorfolino (comercialmente disponible de Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oreg. como Neugene) y otros polímeros sintéticos de ácidos nucleicos específicos de secuencias que proporcionan que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el apareamiento de bases y apilamiento de bases, tal como se encuentra en el DNA y el RNA. El término ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos enlazados (LNA), que están descritos en las Patentes de EE.UU. N° 6.794.499, 6.670.461, 6.262.490 y 6.770.748.

55 El(los) ácido(s) nucleico(s) se puede(n) obtener por un proceso de síntesis completamente químico, tal como una síntesis química mediada por una fase sólida, proceder de una fuente biológica, tal como por aislamiento de

cualquier especie que produce ácido nucleico, o por procesos que implican la manipulación de ácidos nucleicos por herramientas de biología molecular, tales como replicación del DNA, amplificación por PCR, transcripción inversa o de una combinación de estos procesos.

Una “sonda” de ácido nucleico es un oligonucleótido capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria por medio de uno o más tipos de enlaces químicos, generalmente por apareamiento de bases complementarias, normalmente por la formación de enlaces de hidrógeno, formando así una estructura dúplex. La sonda se une o hibrida a un “sitio de unión a la sonda”. La sonda se puede marcar con un marcador detectable para permitir la detección fácil de la sonda, particularmente una vez que la sonda se ha hibridado a su diana complementaria. Alternativamente, sin embargo, la sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable por unión específica con un ligando que está marcado, bien directa o indirectamente. Las sondas pueden variar significativamente de tamaño. En general, las sondas tienen una longitud de al menos 7 a 15 nucleótidos. Otras sondas tienen una longitud de al menos 20, 30 o 40 nucleótidos. Todavía otras sondas son algo más largas, teniendo una longitud de al menos 50, 60, 70, 80 o 90 nucleótidos. Sin embargo, otras sondas son todavía más largas y tienen una longitud de al menos 100, 150, 200 o más nucleótidos. Las sondas pueden tener también cualquier longitud que esté dentro de cualquier intervalo limitado por cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, una longitud de 15-20 nucleótidos).

Un cebador o sonda puede ser perfectamente complementario de la secuencia de ácidos nucleicos diana o puede ser menos que perfectamente complementario. En ciertas realizaciones, el cebador tiene una identidad de al menos 65% con el complemento de la secuencia de ácidos nucleicos diana en una secuencia de al menos 7 nucleótidos, más típicamente en una secuencia en el intervalo de 10-30 nucleótidos, y con frecuencia en una secuencia de al menos 14-25 nucleótidos, y más frecuentemente tiene una identidad de al menos 75%, una identidad de al menos 85%, una identidad de al menos 90%, o una identidad de al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Ha de entenderse que ciertas bases (por ejemplo, la base en 3' de un cebador) son general y deseablemente, perfectamente complementarias de las bases correspondientes de la secuencia de ácidos nucleicos diana. El cebador y las sondas se aparean típicamente con la secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas.

Las interacciones de unión disponibles presentes en una mezcla dependientes de la afinidad definen la especificidad de unión de dos o más componentes. Generalmente, una alta afinidad de unión para una primera interacción en comparación con afinidades de unión de otras interacciones disponibles que están disponibles para una o más parejas de unión en la primera interacción conducirá a una alta especificidad. Las parejas de unión con alta especificidad forman parejas de unión designadas.

Ahora se hará referencia en detalle a realizaciones particularmente preferidas de la descripción. Los ejemplos de las realizaciones preferidas se ilustran en el apartado de Ejemplos siguiente.

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

En algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos, composiciones y kits para la detección y cuantificación de moléculas diana individuales en muestras biomoleculares. En algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos, composiciones y kits para la detección y cuantificación de moléculas diana individuales en cada célula de una población compleja de células, aunque reteniendo la información específica de la célula con respecto a dicha molécula diana. Por tanto, en algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos, composiciones y kits para la detección y cuantificación de moléculas diana individuales en base de una única célula en muestras con poblaciones complejas de células. Por tanto, en algunas realizaciones, para cada célula, se analiza la cantidad de cada molécula diana asociada con dicha célula. En particular, la descripción proporciona agentes de unión única que son capaces de unirse a moléculas diana individuales. La descripción también proporciona el uso de un código de barras específico del epítipo para etiquetar las moléculas diana. La descripción también proporciona el uso de códigos de barras de origen de la célula para indicar la célula de origen. Por medio de los códigos de barras específicos del epítipo y los códigos de barras de origen de la célula, la unión de agentes de unión única a moléculas diana da como resultado la identificación de las moléculas diana. También se proporcionan métodos para preparar y usar dichos agentes de unión única y/o códigos de barras específicos del epítipo y/o códigos de barras de origen de la célula. Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden usar en una amplia variedad de aplicaciones, tales como aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, control de calidad y cribado. Algunas realizaciones de la descripción se refieren a métodos, composiciones y kits para etiquetar individualmente células.

El término “epítipo” y “molécula diana” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a la molécula de interés (partes de ella o la molécula completa) que se detectan y/o cuantifican por los métodos descritos en la presente memoria.

Ciertos aspectos de la descripción se refieren a la detección de múltiples moléculas diana. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan beneficios potenciales en las áreas de detección de múltiples moléculas diana, cuantificación y sensibilidad. En algunas realizaciones, la descripción proporciona métodos y composiciones para el estudio de múltiples mediciones de proteínas y/o múltiples mediciones de ácidos nucleicos que son sensibles y fiables.

La multiplexación dentro de una muestra a un nivel de una única célula es una ventaja clave de este método. La multiplexación dentro de una muestra ahorra trabajo significativo, reduce los requisitos de cantidad de muestra proporcionales al número de mediciones y mejora la precisión por eliminación de errores compuestos por las etapas de medición y manipulación separadas de las muestras. Además, la obtención de mediciones de múltiples moléculas diana en una única célula en una población compleja de células proporciona una mejor comprensión de los procesos fisiológicos dentro de cada célula individual. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria permiten el agrupamiento de diferentes muestras durante el procesamiento para ser analizadas de una vez. Esto ofrece ventajas de rendimiento y puede acelerar el análisis de diferentes muestras.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona agentes de unión única (UBA) para el análisis de moléculas diana. En algunas realizaciones, la descripción proporciona una población de UBA para uso en un ensayo multiplexado. Cada UBA en la población es específico para una molécula diana. Por tanto, el UBA proporciona la especificidad para la molécula diana reconocida en una célula. A continuación, se detecta la unión de las moléculas diana a los UBA utilizando códigos de barras específicos del epítipo (ESB) y códigos de barras de origen de la célula (COB). Cada ESB comprende un código único que se puede asociar a una molécula diana específica. Cada COB comprende un código único que se puede asociar a una célula específica de origen.

En algunas realizaciones, los ESB se unen, directa o indirectamente, al UBA. En otras realizaciones, los ESB se unen a los UBA en una célula o muestra, por ejemplo, como parte del procedimiento de ensayo. Un COB único se asocia a los UBA en una célula específica de modo que cada COB se puede asociar a las moléculas diana unidas a los UBA en dicha célula. En algunas realizaciones, la combinación específica de ESB/COB se refiere como una cantidad de información que representa cada molécula diana o epítipo (véase la Figura 1).

En algunas realizaciones, el COB está compuesto de una o más subunidades polímeras analizables (APS). Ciertos aspectos de la presente descripción se refieren a la selección de una colección o población de APS diseñadas (por ejemplo, secuencias sintéticas). En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una población de APS diseñadas (por ejemplo, sintéticas) en donde dicha APS comprende una secuencia única y/o una molécula detectable, y en donde la combinación de una o más APS diferentes en cada COB tiene una señal o secuencia detectable que lo distingue de otros COB en dicha población. En algunas realizaciones, la descripción proporciona las APS que comprenden secuencias únicas (por ejemplo, sintéticas) que se hibridan con una secuencia de polinucleótidos complementaria única que tiene unido a ella un marcador detectable. En algunas realizaciones, las APS se detectan por secuenciación. En consecuencia, ciertos aspectos de la presente descripción proporcionan una población de COB o de ESB/COB únicos, cada uno compuesto por una única combinación basada en APS, en donde cada COB o ESB/COB en la población es distinto de los otros COB o ESB/COB en la población. Las APS son generalmente capaces de formar una construcción que comprende los COB. Cualquier estructura química que permita dicha formación se puede usar para las APS.

Agente de unión única (UBA)

Los UBA son moléculas o ensamblajes que están diseñados para unirse con al menos una molécula diana, al menos un sustituto de una molécula diana o ambos; y pueden formar, bajo condiciones apropiadas, un complejo molecular que comprende el UBA y la molécula diana. Los ejemplos de moléculas diana incluyen, aunque sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, iones, moléculas pequeñas, monómeros orgánicos y fármacos. Solamente por conveniencia, la mayoría de las realizaciones descritas en la presente memoria se explican en el contexto de los UBA que se unen a una proteína diana o a un mRNA diana. Sin embargo, estas realizaciones también se pueden aplicar a otras moléculas diana. Los términos "proteína", "polipéptido", "péptido" y "secuencia de aminoácidos" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos o aminoácidos sintéticos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado, por ejemplo, por formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente marcador. Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen, aunque sin limitación, glicina y ambos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Los UBA comprenden al menos una porción de reacción que les permite unirse o interactuar con al menos una molécula diana, al menos una parte de al menos una molécula diana, al menos un sustituto de una molécula diana, al menos parte de un sustituto de una molécula diana o sus combinaciones; típicamente de un modo específico de secuencias o un modo específico de la conformación o ambos; por ejemplo, aunque sin limitación, unión de antígeno-anticuerpo, unión de aptámero-diana y similares.

En ciertas realizaciones, los UBA comprenden una porción de identidad o al menos parte de una porción de identidad, por ejemplo, un ESB, un COB, un ESB y/o un oligo enlazador. En ciertas realizaciones, los UBA comprenden una región de captura. En algunas realizaciones, la región de captura se usa para el aislamiento del UBA y/o la inmovilización del UBA en una superficie. La región de captura puede ser una etiqueta de afinidad, una perla, un portaobjetos, una matriz, una microgota, un recinto en un dispositivo para microfluidos o cualquier otra región de captura adecuada en la técnica. En algunas realizaciones, la región de captura es el ESB, por ejemplo, el ESB puede ser una perla detectable, tal como una perla con una signatura espectral única (por ejemplo, una perla

que ha sido teñida internamente con fluoróforos rojos e infrarrojos). Las regiones de captura pueden definir volúmenes de reacción en los que puede tener lugar la manipulación de las composiciones de la descripción.

En algunas realizaciones, el UBA es un anticuerpo. Como se usa en la presente memoria, los términos anticuerpo y anticuerpos se usan en un sentido amplio, para incluir no solo moléculas de anticuerpos intactas, por ejemplo, aunque sin limitación, inmunoglobulina A, inmunoglobulina G e inmunoglobulina M, sino también cualquier o cualesquiera componentes inmunorreactivos de una molécula de anticuerpo que se una inmunoespecíficamente a al menos un epítipo. Dichos componentes inmunorreactivos incluyen, aunque sin limitación, fragmentos FAb, fragmentos FAb', fragmentos FAb'2, fragmentos de anticuerpos monocatenarios (scFv), minianticuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos reticulados, *Affibody*TM, ciclótidos, moléculas y similares. Los productos inmunorreactivos derivados usando técnicas de ingeniería de anticuerpos o de ingeniería de proteínas también están expresamente dentro del significado del término anticuerpos. Se pueden encontrar descripciones detalladas de la ingeniería de anticuerpos y/o proteínas, incluidos los protocolos pertinentes en, entre otros lugares, J. Maynard and G. Georgiou, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2: 339 76 (2000); *Antibody Engineering*, R. Kontermann and S. Dubel, eds., Springer Lab Manual, Springer Verlag (2001); Patente de EE.UU. N° 5.831.012; y S. Paul, *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press (1995).

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

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se unen a un ácido nucleico, por ejemplo, un oligo enlazador o un ESB de ácidos nucleicos. Los métodos para unir ácidos nucleicos a anticuerpos son conocidos en la técnica. Cualquier método adecuado para unir ácidos nucleicos a anticuerpos está abarcado por los métodos de la invención. Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden unir a un ácido nucleico por los métodos descritos en Gullberg et al., *PNAS* 101 (22): pages 228420 - 8424 (2004); y Boozer et al., *Analytical Chemistry*, 76 (23): pages 6967-6972 (2004). Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden unir a un ácido nucleico por unión aleatoria con aminas. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden unir a un ácido nucleico por unión aleatoria con aminas usando una relación de ácido nucleico a anticuerpo de 10 a 1. Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden unir a un ácido nucleico por los métodos descritos en Kozlov et al., *Biopolymers* 5: 73 (5): pages 621-630 (2004). Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden unir a un ácido nucleico por química de hidrazina. Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden unir a un ácido nucleico usando *renacuajos* (sic) como se describe en Nolan, *Nature Methods* 2, 11 - 12 (2005). Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden unir a un ácido nucleico por cualesquiera métodos adecuados conocidos en la técnica para generar anticuerpos modificados por ingeniería que incluyen los descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el UBA es un aptámero. Los aptámeros incluyen aptámeros de ácidos nucleicos (es decir, moléculas de DNA monocatenario o moléculas de RNA monocatenario) y aptámeros peptídicos. Los aptámeros se unen a moléculas diana de una manera muy específica, dependiente de la conformación, típicamente con una afinidad muy alta, aunque si se desea se pueden seleccionar aptámeros con una menor afinidad de unión. Se ha demostrado que los aptámeros distinguen entre las dianas basándose en diferencias estructurales muy pequeñas, tal como la presencia o ausencia de un grupo metilo o hidroxilo, y ciertos aptámeros pueden distinguir entre los enantiómeros D y L. Se han obtenido aptámeros que se unen a dianas moleculares pequeñas, incluyendo fármacos, iones metálicos y colorantes orgánicos, péptidos, biotina y proteínas, que incluyen, aunque sin limitación, estreptavidina, VEGF y proteínas virales. Se ha demostrado que los aptámeros retienen la actividad funcional después de biotilación, marcaje con fluoresceína y cuando se unen a superficies de vidrio y microesferas.

Los aptámeros de ácidos nucleicos, incluidos los espiegelmeros, se identifican por un proceso de selección *in vitro* conocido como evolución sistemática de ligandos por amplificación exponencial (SELEX). En el proceso SELEX, se

seleccionan habitualmente colecciones combinatorias muy grandes de oligonucleótidos, por ejemplo 1014 a 1015 secuencias individuales, frecuentemente tan grandes como con una longitud de 60 - 100 nucleótidos, por un proceso iterativo de selección y amplificación *in vitro*. La mayoría de las dianas se enriquecen por afinidad en 8 - 15 ciclos y el proceso se ha automatizado permitiendo un aislamiento más rápido de aptámeros. Los aptámeros peptídicos se identifican típicamente por varias técnicas diferentes de ingeniería de proteínas conocidas en la técnica, que incluyen, aunque sin limitación, exposición de fagos, exposición de ribosomas, exposición de mRNA, tecnología de fagos infectados selectivamente (SIP) y similares. El experto en la técnica entenderá que los aptámeros de ácidos nucleicos y los aptámeros peptídicos se pueden obtener siguiendo procedimientos convencionales y sin experimentación excesiva. Las descripciones detalladas de los aptámeros, incluidos los protocolos pertinentes, se pueden encontrar en, entre otros lugares, L. Gold, *J. Biol. Chem.*, 270(23):13581-84 (1995); S. Jayasena, *Clin. Chem.*, 45:1628-50 (1999); V. Sieber et al., *Nat Biotechnol.* 16 (10):955-60 (1998); D. Wilson and J. Szostak, *Ann. Rev. Biochem.* 68:611-47 (1999); L. Jermutus et al., *Eur. Biophys. J.*, 31:179-84 (2002); S. Spada et al., *Biol. Chem.*, 378:445-56 (1997); B. Wlotzka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:8898-8902 (2002).

En algunas realizaciones, el aptámero se ligará o hibridará al ácido nucleico tal como un oligo enlazador o un ESB de ácido nucleico. La hibridación o ligación de aptámeros se puede realizar por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar una ligación enzimáticamente por al menos una DNA ligasa o al menos una RNA ligasa, por ejemplo, aunque sin limitación, DNA ligasa de T4, RNA ligasa de T4, ligasa de *Thermus thermophilus* (Tth), DNA ligasa de *Thermus aquaticus* (Taq) o ligasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu). La ligación también se puede realizar por ligación química, usando agentes activadores y reductores, tales como carbodiimida, bromuro de cianógeno (BrCN), imidazol, 1-metilimidazol/carbodiimida/cistamina, N-cianoimidazol, ditiotretitol (DTT) y luz ultravioleta.

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

En algunas realizaciones, el UBA es una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo un DNA antisentido para un mRNA diana. La secuencia de ácidos nucleicos tiene preferiblemente una longitud de al menos 15 nucleótidos y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos. En realizaciones específicas, la secuencia específica de la diana tiene una longitud de aproximadamente 10 a 500, 20 a 400, 30 a 300, 40 a 200 o 50 a 100 nucleótidos. En otras realizaciones, la secuencia específica de la diana tiene una longitud de aproximadamente 30 a 70, 40 a 80, 50 a 90 o 60 a 100, 30 a 120, 40 a 140 o 50 a 150 nucleótidos.

Código de barras específico del epítipo (ESB)

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un código de barras específico del epítipo (ESB). Cada ESB comprende un código único que se puede asociar a una molécula diana específica. Los ESB son moléculas o ensamblajes que están diseñados para unirse con al menos un UBA o parte de un UBA; y pueden, en condiciones apropiadas, formar un complejo molecular que comprende el ESB, el UBA y la molécula diana.

Los ESB pueden comprender al menos una porción de identificación de la identidad que les permite unirse o interactuar con al menos un UBA; típicamente en un modo específico de secuencias o un modo específico de conformación o ambos; por ejemplo, aunque sin limitación, unión UBA-anticuerpo, unión aptámero-diana y similares. En algunas realizaciones, los ESB se unen, directa o indirectamente, al UBA. En otras realizaciones, los ESB se unen a los UBA en una célula o muestra, por ejemplo, como parte del procedimiento de ensayo.

En ciertas realizaciones, el ESB es una superficie sólida o una región de captura, por ejemplo, el ESB puede ser una perla detectable, tal como una perla con una signatura espectral única (por ejemplo, una perla que ha sido teñida internamente con fluoróforos rojos e infrarrojos). En algunas realizaciones, el UBA se une directa o indirectamente a la región de captura.

En ciertas realizaciones, los ESB comprenden un resto enlazador común, por ejemplo, un oligo enlazador. En ciertas realizaciones, el oligo enlazador común es complementario de un oligo enlazador común en las subunidades polímeras analizables (APS) que forman el código de barras de origen de la célula (COB).

En ciertas realizaciones, los ESB comprenden una región de captura. En algunas realizaciones, la región de captura se usa para el aislamiento de los ESB y/o la inmovilización de los ESB en una superficie. La región de captura puede ser una etiqueta de afinidad, una perla, un portaobjetos o una matriz. En algunas realizaciones, la región de captura es una perla detectable, tal como una perla con una signatura espectral única (por ejemplo, una perla que ha sido teñida internamente con fluoróforos rojos e infrarrojos).

En algunas realizaciones, el ESB es un anticuerpo o uno de sus fragmentos, un aptámero, un ácido nucleico o peptido, como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, el ESB es un ácido nucleico. En algunas realizaciones, una parte del ácido nucleico se amplifica con métodos de cadena de ramificación o de círculo rodante, como se conoce en la técnica.

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

En algunas realizaciones, el ESB es una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo un ácido nucleico antisentido para una secuencia de ácidos nucleicos diana complementaria. La secuencia de ácidos nucleicos tiene preferiblemente una longitud de al menos 15 nucleótidos y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos. En realizaciones específicas, la secuencia específica de la diana tiene una longitud de aproximadamente 10 a 500, 20 a 400, 30 a 300, 40 a 200 o 50 a 100 nucleótidos. En otras realizaciones, la secuencia específica de la diana tiene una longitud de aproximadamente 30 a 70, 40 a 80, 50 a 90 o 60 a 100, 30 a 120, 40 a 140 o 50 a 150 nucleótidos.

Código de barras de origen de la célula (COB)

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un código de barras de origen de la célula (COB). Cada COB proporciona un código único que se puede asociar a una célula de origen específica. En algunas realizaciones, por la unión del COB a un resto enlazador común (por ejemplo, oligo enlazador común) asociado con un ESB, el código COB identifica las células de origen de la molécula diana a la que se une el complejo UBA/ESB. Por tanto, en algunas realizaciones, los COB de la descripción comprenden dos porciones principales: (i) una secuencia específica para un resto enlazador común (por ejemplo, oligo enlazador común) asociada a una sonda UBA/ESB; y (ii) un código único que se puede asociar a una célula de origen específica.

En algunas realizaciones, los COB son estructuras modulares. En algunas realizaciones, el COB comprende una pluralidad de diferentes subunidades polímeras analizables (APS). En algunas realizaciones, los COB comprenden una pluralidad de APS unidas en una combinación lineal. En algunas realizaciones, un COB es una entidad molecular que contiene ciertos elementos básicos: (i) una pluralidad de APS que comprenden regiones de unión al marcador unidas en combinación lineal para formar una cadena principal, y (ii) secuencias de polinucleótidos complementarias, que comprenden un marcador, que son complementarias y están unidas a las regiones de unión del marcador de la cadena principal. El término región de unión al marcador incluye una región de secuencia de polinucleótidos definida dentro de una cadena principal dada que puede servir como un punto de unión individual para una molécula detectable. En algunas realizaciones, los COB comprenden una pluralidad de APS diferentes unidas en una combinación lineal, en donde las APS comprenden moléculas pequeñas de peso determinista. En algunas realizaciones, el COB comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más APS únicas unidas en una combinación lineal. En algunas realizaciones, el COB comprende 4 o más APS unidas en combinación lineal.

En algunas realizaciones, la pluralidad de APS unidas en combinación lineal puede comprender secuencias de ácidos nucleicos diseñadas exclusivamente. Además, la pluralidad de las APS unidas en combinación lineal en los COB puede comprender al menos un molde, por ejemplo, aunque sin limitación, al menos una secuencia de ácidos nucleicos, tal como al menos parte de un genoma viral lineal o linealizable, tal como los genomas de adenovirus, virus de la hepatitis, herpesvirus, rotavirus y similares, o bacteriófagos, tales como lambda, M13, ϕ X-174, bacteriófagos de la serie T, y similares, incluyendo sus derivados que comprenden casetes de clonación, polienlazadores, y similares; plásmidos, tales como pBR322 y plásmidos de las series pUC, etc., incluyendo sus derivados que comprenden casetes de clonación, polienlazadores, y similares; moldes sintéticos; moldes que comprenden secuencias artificiales; y similares. El experto en la técnica entenderá que prácticamente cualquier porción de ácido nucleico puede servir como molde para fabricar un COB siempre que sea suficientemente grande para incluir al menos dos APS, o se puede combinar con al menos otra secuencia de ácidos nucleicos de modo que la secuencia combinada sea lo suficientemente grande como para incluir al menos dos APS. En algunas realizaciones, los ESB, las APS o los COB de la descripción se refieren a bloques constitutivos moldeables. En algunas realizaciones, los UBA de la descripción se refieren a moléculas moldeables.

En algunas realizaciones, el COB también comprende una o más APS que contienen un resto enlazador común (por ejemplo, oligo enlazador común). El resto enlazador común se puede unir directa o indirectamente a las APS. Por tanto, el resto enlazador común se puede unir covalentemente a un COB o el resto enlazador común se puede unir al COB más tarde en el ensayo. El término resto enlazador común incluye secuencias repetidas en tándem de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos. El resto enlazador común se puede unir a la región 5' o a la región 3' de un COB, y se puede utilizar para la captura e inmovilización de un COB para formación de imágenes o detección, tal como uniendo a un sustrato sólido una secuencia que sea complementaria del resto enlazador común.

Los elementos de un COB se pueden encontrar en una única entidad molecular (un COB singular) o dos entidades moleculares distintas (un COB dual). Cada entidad molecular puede estar compuesta de una molécula o más de una molécula unidas entre sí por medios covalentes o no covalentes. En algunas realizaciones, cada componente de un COB dual tiene un UBA/ESB específico de la molécula diana que se une a un sitio diferente en la misma molécula diana. Cuando se usa un sistema de COB dual, uno de los COB puede no estar marcado. En algunas realizaciones, el COB no marcado puede comprender una región de captura.

En diversas realizaciones de la descripción, un COB se construye a partir de bloques constitutivos de APS individuales. En algunas realizaciones, las APS se combinan linealmente. En algunas realizaciones, el COB construido a partir de las APS mantiene el orden de las APS. En algunas realizaciones, los COB comprenden estructuras ramificadas. En algunas realizaciones, las estructuras ramificadas de COB comprenden información sobre el orden de adición de las APS. En diversas realizaciones, la APS individual que forma un COB puede ser descodificada. En algunas realizaciones, el orden o el orden de adición de las APS que forman el COB puede ser descodificado. Sin estar vinculado a ninguna teoría, las plataformas que permiten que el orden de adición de las APS sea protegido y descodificado conducen a que se genere un mayor número de COB diferentes a partir de un número equivalente de bloques constitutivos de APS. Con un número mayor de tipos de moléculas de COB totales, disminuye la probabilidad de que dos células/partículas en una población sean marcadas con el mismo COB. Por tanto, los métodos de diversas realizaciones de la descripción permiten una mayor significación estadística para la determinación de la identidad de células/partículas.

En algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos complementarias unidas a una APS sirven para unir moléculas detectables, o monómeros marcadores, a la APS. Las secuencias de polinucleótidos complementarias se pueden marcar directamente, por ejemplo, por incorporación covalente de una o más moléculas detectables en la secuencia de polinucleótidos complementaria. Alternativamente, las secuencias de polinucleótidos complementarias se pueden marcar indirectamente, tal como por incorporación de biotina u otra molécula capaz de una interacción con ligandos específica de la secuencia de polinucleótidos complementaria. En dichos casos, el ligando (por ejemplo, estreptavidina en el caso de la incorporación de biotina en la secuencia de polinucleótidos complementaria) se puede unir covalentemente a la molécula detectable. Cuando las moléculas detectables unidas a una APS no se incorporan directamente en la secuencia de polinucleótidos complementaria, esta secuencia sirve como puente entre la molécula detectable y la APS, y puede denominarse como molécula puente, por ejemplo, un ácido nucleico puente.

En algunas realizaciones, los COB basados en ácidos nucleicos, los complejos COB-ESB o los complejos COB/ESB/UBA de la presente descripción comprenden ácidos nucleicos, que pueden ser purificados por afinidad o inmovilizados usando un ácido nucleico, tal como un oligonucleótido, que sea complementario de una región constante del COB (por ejemplo, resto enlazador común, región de captura o etiqueta de afinidad). Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones los COB comprenden al menos un resto enlazador común, que puede servir como etiqueta de afinidad para la purificación y/o para la inmovilización (por ejemplo, a una superficie sólida). El resto enlazador común puede comprender dos o más regiones repetidas en tándem de nucleótidos repetidos, tales como una serie de repeticiones de 15 bases. En dichas realizaciones ilustrativas, el COB, bien formando complejo con un ESB, ESB/UBA, una molécula diana/UBA/ESB o de otra manera, se puede purificar o inmovilizar por un reactivo de afinidad recubierto con un oligonucleótido de 15 bases que es el complemento inverso de la unidad de repetición.

Los COB, los complejos COB-ESB o los complejos COB/ESB/UBA se pueden purificar en dos o más etapas de selección por afinidad. Por ejemplo, en las realizaciones en las que el COB está unido a un complejo ESB/UBA, el COB puede comprender una etiqueta de afinidad. En otras realizaciones, cuando se usa un COB dual, un COB puede comprender una primera etiqueta de afinidad y el otro COB puede comprender una segunda etiqueta de afinidad (diferente). Los COB se mezclan con las moléculas diana y los complejos que comprenden las dos sondas de los COB duales se separan de los materiales no unidos por purificación por afinidad frente a una o ambas etiquetas de afinidad individuales.

En la primera etapa, la mezcla se puede unir a un reactivo de afinidad para la primera etiqueta de afinidad, de modo que solo se purifiquen las sondas que comprenden la primera etiqueta de afinidad y los complejos deseados. Los materiales unidos se liberan del primer reactivo de afinidad y opcionalmente se unen a un reactivo de afinidad para la segunda etiqueta de afinidad, permitiendo la separación de los complejos de los COB que comprenden la primera etiqueta de afinidad. En este punto, solo se unirían los complejos completos. Los complejos se liberan finalmente del reactivo de afinidad para la segunda etiqueta de afinidad y luego se analizan por los métodos descritos en la presente memoria. El reactivo de afinidad puede ser cualquier superficie sólida recubierta con una pareja de unión para la etiqueta de afinidad, tal como una columna, una perla (por ejemplo, una perla de látex o magnética) o un portaobjetos recubierto con la pareja de unión. Se puede usar una variedad de etiquetas de afinidad conocidas en la técnica, por ejemplo, para purificar y/o inmovilizar los COB, los complejos COB-ESB o los complejos COB/ESB/UBA. En algunas realizaciones, se une un anclaje de biotina al COB, ESB y/o UBA, permitiendo la inmovilización de los COB, los complejos COB-ESB o los complejos COB/ESB/UBA sobre una superficie de estreptavidina (por ejemplo, un portaobjetos o una perla recubiertos). En algunas realizaciones, una etiqueta de afinidad se une a un UBA, por ejemplo, para purificar y/o inmovilizar el UBA. Se puede usar una etiqueta de afinidad para la unión a perlas u otras matrices para una variedad de aplicaciones útiles que incluyen, aunque sin limitación, la purificación. Ejemplos de etiquetas de afinidad y métodos para prepararlas y/o unirlos a los ácidos nucleicos se describen en la patente de EE.UU. 7.473.767; Solicitudes de patentes de EE.UU. N° 10/542458; 12/324357; 11/645270 y 12/541131. En algunas realizaciones, al menos dos de ESB, los UBA, las APS y los COB comprenden diferentes composiciones químicas descritas en la presente memoria o cualquier otra composición adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, un ESB puede comprender un péptido y/o un ácido nucleico, mientras que una APS comprende un péptido o un peptoide. Cualquier combinación de los compuestos químicos descritos se considera dentro del alcance de la invención.

En diversas realizaciones, los ESB, las APS y/o los COB pueden ser moldes, ordenados y/o descodificados. En algunas realizaciones, se puede detectar el orden de cualquiera de estas subunidades en una construcción. Los ESB, las APS y/o los COB pueden proporcionar moldes para la adición de otro cualquiera de los ESB, las APS y/o los COB, por ejemplo mediante ácido nucleico o cualquier otra complementariedad química adecuada conocida en la técnica. Los ESB, las APS y/o los COB pueden codificar productos secundarios, tales como un ácido nucleico que codifica otro ácido nucleico o un péptido. En algunas realizaciones, la detección de los ESB, las APS y/o los COB comprende descodificar los mismos, por ejemplo, generando un amplicón o expresando un péptido a partir de los ESB, las APS y/o los COB y secuenciando o detectando de otro modo los productos.

Las secuencias, los pesos o las señales proporcionadas por los monómeros de marcaje asociados con las diversas APS del COB de una célula dada permiten la identificación única del COB. Por ejemplo, cuando se usan secuencias de ácidos nucleicos, un COB que tiene una identidad única o una signatura de secuencia única se asocia con un UBA que reconoce una molécula diana específica o una de sus porciones. La detección de la secuencia del COB permite la detección de la presencia de la molécula diana en la mezcla (análisis cualitativo). En otro ejemplo, cuando se usan marcadores fluorescentes, un COB que tiene una identidad única o una signatura espectral única se asocia con un UBA que reconoce una molécula diana específica o una de sus porciones. La detección de la señal del COB, tal como el código espectral de un COB marcado fluorescentemente, permite la detección de la presencia de la molécula diana en la mezcla (análisis cualitativo). Incluso en otro ejemplo, cuando se usan moléculas pequeñas según el procedimiento de síntesis combinatoria, un COB que tiene un peso determinista único se asocia con un UBA que reconoce una molécula diana específica o una de sus porciones. La detección del peso determinista del COB (por ejemplo, por espectrometría de masas) permite la detección de la presencia de la molécula diana en la mezcla (análisis cualitativo). El recuento y la cuantificación de los códigos (por ejemplo, secuencias, monómeros marcadores o pesos deterministas) asociados a una signatura determinada (por ejemplo, código espectral, secuencia única o peso determinista único) permite el recuento o la cuantificación de todas las moléculas de la mezcla asociadas al UBA acoplado al COB (análisis cuantitativo). Los complejos UBA/ESB/COB son por tanto útiles para el diagnóstico o pronóstico de diferentes estados biológicos (por ejemplo, enfermedad frente a salud) por análisis cuantitativo de marcadores biológicos conocidos.

Además, la exquisita sensibilidad de detección y cuantificación de moléculas únicas proporcionada por los COB de la invención permite la identificación de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico, incluidos aquellos cuyas fluctuaciones entre los diferentes estados biológicos son demasiado ligeras para detectar una correlación con un estado biológico particular utilizando métodos moleculares tradicionales. La sensibilidad de la detección molecular basada en los COB permite un análisis farmacocinético detallado de agentes terapéuticos y de diagnóstico en pequeñas muestras biológicas.

La síntesis de los COB se puede realizar por cualesquiera métodos adecuados conocido en la técnica, incluyendo el descrito en la presente memoria.

En diversas realizaciones, la invención se refiere a un COB que ha de ser sintetizado por adición escalonada de subunidades polímeras analizables (APS) que comprenden oligonucleótidos. El COB se puede unir al UBA por medio de un enlazador común (CL). El CL también puede ser parte de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, también se proporciona un código de barras específico del epítipo como un oligonucleótido. En algunos casos, el código de barras específico del epítipo puede ser incluido en el oligonucleótido que comprende el enlazador común. En algunas realizaciones, CL, ESB y las APS comprenden todas secuencias de oligonucleótidos. Por consiguiente, un oligonucleótido CL se puede ligar a un oligonucleótido ESB o APS. Para la hibridación se pueden utilizar regiones de apareamiento sustancialmente complementarias o exactamente complementarias. Se puede proporcionar una región de apareamiento en ambos extremos de un oligonucleótido ESB o APS. En algunas realizaciones, las APS se añaden en diversas etapas de una síntesis por agrupamiento y división o cualquier otra síntesis escalonada adecuada conocida en la técnica. Se puede incorporar a los oligonucleótidos una región de apareamiento específica para cada etapa de una síntesis escalonada. Sin estar vinculados a ninguna teoría, si durante una etapa se omite una adición de oligonucleótido, la región de apareamiento específica de la etapa del siguiente oligonucleótido no se hibridará eficazmente a la región de apareamiento específica de la etapa del oligonucleótido previa que esté disponible. Por tanto, algunas realizaciones de la invención proporcionan métodos para detener la síntesis de los COB a los que les falta una o más APS.

En algunas realizaciones, los UBA se marcan con diferentes oligonucleótidos CL, cada uno con una secuencia de ESB única específica del UBA y una región de apareamiento común. En muchos casos, las APS se ensamblan a los COB durante las rondas de síntesis por agrupamiento y división. En estos casos, en cada serie, la muestra se divide en n recipientes diferentes. Se puede añadir un oligonucleótido APS diferente a cada recipiente, totalizando m APS diferentes. En algunas realizaciones, n y m son iguales. En otras realizaciones, n es mayor que m o m es mayor que n . Cada APS se puede diseñar de manera que se hibride selectivamente a una región de apareamiento añadida durante la ronda anterior (Figura 6). En diversas realizaciones, se incorpora un par de regiones de apareamiento específicas de rondas a cada APS. Las regiones de apareamiento se pueden incorporar a cada extremo de la APS. Las regiones de apareamiento incorporadas a cada extremo de una APS pueden ser diferentes. Por consiguiente, una región de apareamiento de una APS añadida puede ser complementaria de una región de apareamiento disponible de un ensamblaje propiciador de una ronda previa.

En algunas realizaciones, las APS se unen entre sí y/o a un CL usando un cebador de apareamiento (Figuras 7 y 8). El cebador de apareamiento puede comprender una primera región complementaria del CL o una APS añadida durante la ronda previa de una síntesis escalonada. El cebador de apareamiento puede comprender también una segunda región complementaria de la APS que se añade durante una ronda actual. Por tanto, el cebador de apareamiento puede hibridar a dos subunidades de oligonucleótidos de rondas subsiguientes uniéndolas entre sí. En algunas realizaciones, las primeras regiones complementarias de los cebadores de apareamiento de cada ronda son diferentes de las primeras regiones complementarias de los cebadores de apareamiento de otras rondas (Figura 7). En algunas realizaciones, las segundas regiones complementarias de los cebadores de apareamiento de cada ronda son diferentes de las segundas regiones complementarias de los cebadores de apareamiento de otras rondas. En algunas realizaciones, las regiones complementarias primera o segunda de los cebadores de apareamiento de diferentes rondas son compartidas entre las rondas (Figura 8).

En algunas realizaciones, un oligonucleótido CL comprende pares de regiones de apareamiento en bucle (Figuras 9 y 10). Por consiguiente, las APS se pueden diseñar para hibridarse al CL en una geometría en bucle, hibridándose en cada extremo al CL a lo largo de las regiones de apareamiento en bucle. Las regiones de apareamiento en bucle pueden ser específicas de la ronda. La hibridación puede poblar las APS a lo largo del CL. Las APS se pueden enlazar entre sí usando cualquier método descrito en la presente memoria u otros métodos comunes conocidos en la técnica. Las APS se pueden diseñar de manera que no se hibriden eficazmente al CL a lo largo de las regiones de apareamiento en bucle específicas de otras rondas. En consecuencia, si falta una APS de una serie particular, las APS no se pueden enlazar entre sí correctamente, dependiendo del proceso de enlace. Alternativamente, se puede sintetizar un COB con una APS ausente, cuya localización está flanqueada por un par de regiones de apareamiento en bucle. El COB resultante puede ser por tanto analizado y puede bien ser descartado o la información recuperada puede ser tratada alternativamente.

Cada APS en una ronda dada puede comprender una secuencia de subcódigo única que es diferente del resto de las APS en dicha ronda (Figuras 6-11). El subcódigo puede comprender una secuencia de nucleótidos única.

Un CL, o una o más APS, pueden comprender además una región de etiqueta aleatoria que permite la normalización subsiguiente de los COB detectados (Figuras 6-11). Se conocen en la técnica variaciones de métodos adecuados que hacen uso de dichas regiones de etiqueta aleatorias, por ejemplo, véase Casbon et al., (*Nucleic Acids Research*, 2011, 39:12, e81). En algunos casos, la región de etiqueta aleatoria puede actuar como un contador molecular para estimar el número de moléculas molde asociadas con cada variante de la secuencia. En algunos casos, se incorpora un contador molecular a un CL, ESB, APS o un COB ensamblado antes de una reacción de amplificación, por ejemplo una PCR. Se puede incorporar una colección de contadores moleculares que comprende regiones de bases degeneradas (DBR) a los CL, ESB, APS o COB ensamblados. El número de DBR únicas en una colección generalmente está limitado por la longitud y composición de bases de la DBR. Por ejemplo, un solo nucleótido en una DBR permitiría cuatro contadores posibles diferentes, uno por cada base. Las DBR más largas pueden producir números más altos de secuencias de contador únicas. Un contador molecular de una colección de secuencias se puede incorporar a un CL, ESB, APS o un COB ensamblados. El contador molecular se puede usar para determinar si una variante de una secuencia se asocia con una única molécula molde, o alternativamente, múltiples moléculas molde. El número de diferentes secuencias de DBR asociadas con una variante de una secuencia puede servir como una medición directa del número de moléculas molde iniciales. Esta información puede complementar o reemplazar la información proporcionada por los números leídos de cada variante de secuencia, incluyendo, por ejemplo, números leídos después de una reacción de amplificación, por ejemplo por PCR. Las DBR también se pueden usar para determinar la probabilidad de que una variante de una secuencia derive de un error de polimerasa durante una reacción de amplificación o sea una variante original verdadera antes de una reacción de amplificación, por ejemplo por PCR. En algunas realizaciones, los agentes de unión única (UBA) se fijan a sus dianas antes o al mismo tiempo del ensamblaje de los COB.

Varias realizaciones de la invención se refieren al ensamblaje de los COB sobre la superficie de las células. Los COB pueden, por ejemplo, ser ensamblados asociados con los UBA que se dirigen a los componentes de la superficie celular. En algunas realizaciones, los UBA se fijan a los componentes de la superficie celular antes o al mismo tiempo que el ensamblaje de los COB. En algunas realizaciones, los UBA se suministran en células o en compartimentos celulares. En algunas realizaciones, los COB se ensamblan asociados con los UBA dentro de las células o compartimentos celulares. Las células se pueden fijar antes de la adición de los UBA, los ESB o antes del ensamblaje de los COB. Los métodos de permeabilización de las células adecuados son conocidos en la técnica y se pueden usar para suministrar componentes del ensayo en células y componentes celulares.

En algunas realizaciones, el ensayo se realiza en cuerpos que no son células. Los materiales de soporte adecuados conocidos en la técnica, tales como perlas o revestimientos superficiales, pueden actuar de la misma manera que actuaría una célula para proporcionar una superficie de unión original. Los materiales de soporte se pueden decorar con dianas de unión. En algunas realizaciones, los materiales de soporte resuelven espacialmente dianas de unión de cada uno.

En algunas realizaciones, el ensayo puede comprender dianas de unión primaria y una o más dianas de unión secundarias que son capaces de unirse a la diana primaria. Un material de soporte, por ejemplo, puede estar recubierto con una o más dianas primarias. Se puede proporcionar una colección de dianas secundarias para unirse a las dianas primarias. Se pueden proporcionar UBA para unirse a epítomos de las dianas primarias y/o secundarias.

Los COB se pueden ensamblar asociados a estos UBA como se ha descrito para otros tipos de dianas. La unión interdependiente de las dianas secundarias a las dianas primarias se puede monitorizar analizando los COB.

En algunas realizaciones, se ensamblan múltiples COB en la misma molécula de UBA.

En algunas realizaciones, los ESB o COB ensamblados codifican una secuencia derivada. En algunas realizaciones, los ESB y/o COB comprenden una secuencia de polinucleótidos. En algunos casos, el ESB y/o COB pueden codificar una secuencia de RNA. En algunos casos, el ESB y/o el COB codifican una secuencia peptídica. El ESB y/o el COB pueden codificar la secuencia peptídica directamente. Alternativamente, el COB puede codificar una secuencia peptídica indirectamente, por ejemplo, por medio de una secuencia de RNA intermediaria. Por ejemplo, un ESB o COB polinucleotídico puede codificar un marco de lectura abierto. En algunos casos, la secuencia peptídica se traduce después de introducir el ESB o COB en una construcción que permita la expresión del péptido. En algunas realizaciones, la construcción es un vector.

En algunas realizaciones, los ESB y los COB se ensamblan a partir de oligonucleótidos. El agente de enlace puede ser una ligasa. En algunas realizaciones, la ligasa es DNA ligasa de T4, usando procedimientos bien conocidos (Maniatis, T. en *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). También se pueden usar otras DNA ligasas. Con respecto a la ligación, se pueden usar otras ligasas, tales como las derivadas de organismos termófilos, permitiendo así la ligación a temperaturas más altas, lo que permite el uso de oligonucleótidos más largos (con mayor especificidad) como los ESB, los CL o las APS, que podrían ser apareados y ligados simultáneamente bajo las temperaturas más altas normalmente permisibles para aparear dichos oligonucleótidos. Sin embargo, la ligación no tiene que ser por una enzima y, en consecuencia, el agente enlazador puede ser un agente químico que provoque que se unan el ESB y las APS, a menos que exista un desapareamiento de pares de bases de nucleótidos en la región de apareamiento. Por simplicidad, algunas realizaciones de la descripción se describirán utilizando DNA ligasa de T4 como agente enlazador. Esta enzima requiere la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' que se unirá a un grupo OH en 3' de un oligonucleótido vecino.

Cuando los oligos se apilan entre sí para unirse a una región de apareamiento con una coincidencia perfecta en la unión en sus extremos, da como resultado una unión específica a la región de apareamiento. Los CL, los ESB y las APS se pueden ligar para formar un COB unido a ESB. Los COB unidos a ESB, a su vez, se pueden usar para la detección.

En algunas realizaciones, el ensamblaje de ESB y/o COB comprende el uso de la *química clic*. Los métodos adecuados para unir diversas moléculas usando *química clic* son conocidos en la técnica (para el enlace en la *química clic* de oligonucleótidos, véase, por ejemplo, El-Sagheer et al., (PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011)).

En algunas realizaciones, el ensamblaje de ESB y/o COB tiene lugar dentro de una célula. En algunas realizaciones, los ESB y/o las APS se ensamblan primero dentro de una célula. En algunas realizaciones, los ESB y/o las APS se enlazan dentro de una célula. En algunas realizaciones, los ESB y/o las APS se enlazan fuera de una célula.

En algunas realizaciones, los productos ensamblados se amplifican y, opcionalmente, los resultados se comparan con la amplificación de ácidos nucleicos diana similares de una muestra de referencia. En algunas realizaciones, los productos ligados de las APS se amplifican y, opcionalmente, los resultados se comparan con la amplificación de un COB similar a partir de una muestra de referencia. La amplificación se puede realizar por cualquier medio conocido en la técnica. En algunos casos, los productos ligados se amplifican por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ejemplos de técnicas de PCR que se pueden usar incluyen, aunque sin limitación, PCR cuantitativa, PCR fluorescente cuantitativa (QF-PCR), PCR fluorescente múltiple (MF-PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR), PCR de célula única, PCR de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), PCK-RFLPIRT-PCR-IRFLP, PCR de iniciación en caliente, PCR anidada, PCR *polonony in situ*, amplificación de círculo rodante (RCA) *in situ*, PCR puente, PCR por picotitulación y PCR en emulsión. Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por transcripción, replicación de secuencia autosostenida, amplificación selectiva de secuencias de polinucleótidos diana, reacción en cadena de la polimerasa cebada de secuencias de consenso (CP-PCR), reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR), PCR cebada con oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR) y amplificación de secuencias basadas en ácidos nucleicos (NABSA). Otros métodos de amplificación que se pueden usar en la presente memoria incluyen los descritos en las Patentes de EE.UU. N° 5.242.794; 5.494.810; 4.988.617; y 6.582.938. En algunas realizaciones, la amplificación se realiza dentro de una célula.

En cualquiera de las realizaciones, la amplificación de productos ligados puede tener lugar en un soporte, tal como una perla o una superficie. En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, los COB se pueden ensamblar en dianas de una única célula.

La unicidad de cada sonda UBA/ESB en una población de sondas permite el análisis multiplexado de una pluralidad de moléculas diana. Además, la unicidad de cada sonda de COB en una población de sondas permite el análisis multiplexado de una pluralidad de moléculas diana en células únicas.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, cada COB contiene seis APS. Si las APS han de ser secuenciadas y hay 20 secuencias únicas posibles para la APS, habrá $3,84 \times 10^8$ COB posibles en este ejemplo. Por tanto, en este ejemplo se pueden analizar $3,84 \times 10^8$ células y sus sondas UBA/ESB correspondientes. Dado que en la secuenciación no tiene las restricciones de color presentes en algunos métodos fluorescentes, se pueden analizar múltiples sondas

UBA/ESB por células. En algunas realizaciones, se analizan 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 90, 100 UBA/ESB diferentes por célula. En algunas realizaciones, se analizan hasta 100 UBA/ESB diferentes por célula. En algunas realizaciones, se analizan hasta 1000 UBA/ESB diferentes por célula. En algunas realizaciones, se analizan hasta 2000 UBA/ESB diferentes por célula.

5 En ciertas realizaciones, los métodos de detección se realizan en ensayos múltiples, por los que se detecta una pluralidad de moléculas diana en el mismo ensayo (una única mezcla de reacción). En una realización preferida, el ensayo es un ensayo de hibridación o un ensayo de unión por afinidad en el que se detecta simultáneamente la pluralidad de moléculas diana. En una realización preferida, el ensayo es un ensayo de hibridación o un ensayo de unión por afinidad en el que se detecta simultáneamente la pluralidad de moléculas diana en células únicas. En
10 ciertas realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas en el mismo ensayo es, al menos 2, al menos 5 moléculas diana diferentes, al menos 10 moléculas diana diferentes, al menos 20 moléculas diana diferentes, al menos 50 moléculas diana diferentes, al menos 75 moléculas diana diferentes, al menos 100 moléculas diana diferentes, al menos 200 moléculas diana diferentes, al menos 500 moléculas diana diferentes, o al menos 750 moléculas diana diferentes, o al menos 1000 moléculas diana diferentes. En otras realizaciones, la pluralidad de
15 moléculas diana detectadas en el mismo ensayo es hasta 50 moléculas diana diferentes, hasta 100 moléculas diana diferentes, hasta 150 moléculas diana diferentes, hasta 200 moléculas diana diferentes, hasta 300 moléculas diana diferentes, hasta 500 moléculas diana diferentes, hasta 750 moléculas diana diferentes, hasta 1000 moléculas diana diferentes, hasta 2000 moléculas diana diferentes, o hasta 5000 moléculas diana. Incluso en otras realizaciones, la pluralidad de moléculas diana detectadas está en cualquier intervalo entre los números anteriores de moléculas
20 diana diferentes, tales como, aunque sin limitación, de 20 a 50 moléculas diana diferentes, de 50 a 200 moléculas diana diferentes, de 100 a 1000 moléculas diana diferentes, de 500 a 5000 moléculas diana diferentes, y así sucesivamente.

En algunas realizaciones, la detección es una detección digital. En algunas realizaciones, la detección es directa, es decir, el método adquiere una señal que es generada directamente por la entidad detectada. En algunas
25 realizaciones, la detección es indirecta, es decir, la manipulación de una entidad que se ha de detectar tiene lugar antes de que se adquiera una señal. En algunas realizaciones, una pluralidad de componentes de una entidad que se ha de detectar da lugar a señales de detección directa o indirectamente. En algunas realizaciones, el orden de la pluralidad de los componentes se puede determinar por los métodos de detección descritos en la presente memoria. Dichos métodos de detección se describen también como métodos de detección ordenados o métodos de detección
30 con señales ordenadas.

En cualquiera de las realizaciones, el análisis de detección o cuantificación de los COB se puede realizar por secuenciación. Las subunidades APS o los COB completos se pueden detectar por la secuenciación completa de
35 todas las etiquetas de DNA por cualesquiera métodos adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, Illumina HiSeq 2000, que incluye los métodos de secuenciación descritos en la presente memoria.

La secuenciación se puede llevar a cabo por métodos clásicos de secuenciación de Sanger que son bien conocidos en la técnica. La secuenciación también se puede realizar usando sistemas de alto rendimiento, algunos de los
40 cuales permiten la detección de un nucleótido secuenciado inmediatamente después o durante su incorporación a una cadena en crecimiento, es decir, la detección de la secuencia en tiempo real o sustancialmente en tiempo real. En algunos casos, la secuenciación de alto rendimiento genera al menos 1.000, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 30.000, al menos 40.000, al menos 50.000, al menos 100.000 o al menos 500.000 lecturas de secuencias por hora; siendo cada lectura de al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90,
45 al menos 100, al menos 120 o al menos 150 bases por lectura.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por la máquina HiSeq 2000 de Illumina. Esta máquina utiliza secuenciación reversible basada en terminador por química de síntesis. Esta máquina puede realizar 200 mil millones de lecturas de DNA en ocho días.
50

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por ABI Solid System. Esta plataforma de análisis genético permite la secuenciación masivamente paralela de fragmentos de DNA amplificados clonalmente enlazados a perlas. La metodología de secuenciación se basa en la ligación
55 secuencial con oligonucleótidos marcados con colorante.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por Ion Torrent Personal Genome Machine (PMG). La PGM puede realizar 10 millones de lecturas en dos horas.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de tecnología disponible por Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, Massachusetts) tal como el método de secuenciación de una sola molécula por síntesis (SMSS). La SMSS es única porque permite la secuenciación del genoma humano completo en hasta 24
60 horas. Este método de secuenciación rápida permite también la detección de un nucleótido de un SNP en una secuencia en tiempo sustancialmente real o en tiempo real. Finalmente, la SMSS es poderosa debido a que, al igual que la tecnología MIP, no requiere una etapa de pre-amplificación antes de la hibridación. De hecho, la SMSS no

requiere ninguna amplificación. La SMSS está descrita en parte en las solicitudes de patentes publicadas de EE.UU. 20060024711; 20060024678; 20060012793; 20060012784; y 20050100932.

5 En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de tecnología disponible por 454 Lifesciences, Inc. (Branford, Connecticut), tal como el dispositivo Pico Titer Plate que incluye una placa de fibra óptica que transmite la señal quimioluminiscente generada por la reacción de secuenciación para ser registrada por una cámara CCD en el instrumento. Este uso de fibra óptica permite la detección de un mínimo de 20 millones de pares de bases en 4,5 horas.

10 Los métodos para usar la amplificación de perlas seguidos por detección por fibra óptica se describen en Marguiles, M., et al. "*Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*", *Nature*, doi: 10.1038/nature03959; así como en las solicitudes de patentes de Estados Unidos publicadas N° 20020012930; 20030058629; 20030100102; 20030148344; 20040248161; 20050079510, 20050124022; y 20060078909.

15 En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento se lleva a cabo utilizando una *Clonal Single Molecule Array* (Solexa, Inc.) o secuenciación por síntesis (SBS) utilizando química con terminador reversible. Estas tecnologías están descritas en parte en las Patentes de Estados Unidos N° 6.969.488; 6.897.023; 6.833.246; 6.787.308; y las solicitudes de patentes de Estados Unidos publicadas N° 20040106130; 20030064398; 20030022207; y en Constans, A., *The Scientist* 2003, 17 (13): 36.

20 En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento de RNA o DNA puede tener lugar utilizando los chips AnyDot (Genovox, Alemania). En particular, los chips AnyDot permiten una mejora de 10x - 50x de la detección de la señal de fluorescencia de nucleótidos. Los chips AnyDot y los métodos para usarlos están descritos en parte en las Solicitudes de Publicaciones Internacionales de patentes N° WO02/088382, WO03/020968, WO03/031947, WO2005/044836, PCT/EP05/105657, PCT/EP05/105655; y las solicitudes de patentes alemanas N° DE 101 49 786, DE 102 14 395, DE 103 56 837, DE 10 2004 009 704, DE 10 2004 025 696, DE 10 2004 025 746, DE 10 2004 025 694, DE 10 2004 025 695, DE 10 2004 025 744, DE 10 2004 025 745 y DE 10 2005 012 301.

30 Otros sistemas de secuenciación de alto rendimiento incluyen los descritos en los trabajos de Venter, J., et al., *Science* 16 February 2001; Adams, M. et al., *Science* 24 March 2000; y M. J. Levene, et al., *Science* 299: 682-686, January 2003; así como en las solicitudes de patentes de EE.UU. publicadas N° 2003/0044781 y 2006/0078937. En general, dichos sistemas implican secuenciar una molécula de ácido nucleico diana que tiene una pluralidad de bases por adición temporal de bases mediante una reacción de polimerización que se mide en una molécula de ácido nucleico, es decir, se sigue en tiempo real la actividad de una enzima polimerizante de ácido nucleico en la molécula molde de ácido nucleico que se ha de secuenciar. La secuencia se puede deducir luego identificando qué base se está incorporando en la cadena complementaria en crecimiento del ácido nucleico diana por la actividad catalítica de la enzima polimerizante de ácido nucleico en cada etapa de la secuencia de adiciones de bases. Se proporciona una polimerasa en el complejo de moléculas de ácido nucleico diana en una posición adecuada para moverse a lo largo de la molécula de ácido nucleico diana y extender el cebador oligonucleotídico en un sitio activo. Se proporciona una pluralidad de tipos marcados de análogos de nucleótidos próximos al sitio activo, siendo cada tipo distinguible del análogo de nucleótido complementario de un nucleótido diferente en la secuencia de ácido nucleico diana. La cadena de ácido nucleico en crecimiento se extiende utilizando la polimerasa para añadir un análogo de nucleótido a la cadena de ácidos nucleicos en el sitio activo, donde el análogo de nucleótido que se está añadiendo es complementario del nucleótido del ácido nucleico diana en el sitio activo. Se identifica el análogo de nucleótido añadido al cebador oligonucleotídico como resultado de la etapa de polimerización. Las etapas de proporcionar análogos de nucleótidos marcados, polimerizar la cadena de ácidos nucleicos en crecimiento e identificar el análogo de nucleótido añadido se repiten para que la cadena de ácidos nucleicos se extienda más y se determine la secuencia del ácido nucleico diana.

45 En diversas realizaciones, los oligonucleótidos ESB o COB se identifican directamente. La identificación directa puede comprender la secuenciación de ácidos nucleicos descrita anteriormente. En algunas realizaciones, las secuencias de las APS codifican secuencias derivadas que a su vez son identificadas. Por ejemplo, un polinucleótido ESB y COB se puede traducir en una secuencia peptídica. La secuencia peptídica se puede identificar luego utilizando métodos adecuados conocidos en la técnica.

50 En algunas realizaciones, se identifica una secuencia que representa un COB o ESB usando análisis por espectrometría de masas. Los métodos de secuenciación que comprenden espectrometría de masas son conocidos en la técnica. En diversas realizaciones, una secuencia derivada, tal como un péptido, se secuenciar usando métodos de espectrometría de masas. En algunas realizaciones, los métodos de espectrometría de masas comprenden fragmentación. En algunas realizaciones, los métodos de espectrometría de masas comprenden secuenciación del N-terminal. En algunas realizaciones, los métodos de espectrometría de masas comprenden secuenciación del C-terminal. En algunas realizaciones, los métodos de espectrometría de masas comprenden degradación de Edman. En diversas realizaciones, la secuencia derivada se somete a un proceso de separación antes de su identificación. En algunas realizaciones, el proceso de separación comprende cromatografía. En algunas realizaciones, el proceso de separación comprende HPLC. Los métodos de separación adecuados para el proceso de separación comprenden, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de interacción hidrófoba. La cromatografía de intercambio iónico puede usar cualquier material matriz que comprenda grupos funcionales que

sean fuertemente ácidos (típicamente, grupos ácido sulfónico, por ejemplo, poliestireno-sulfonato de sodio o poliAMPS), fuertemente básicos (grupos amino cuaternarios, por ejemplo, grupos trimetilamonio, por ejemplo, poliAPTAC), débilmente ácidos (principalmente, grupos ácido carboxílico), o débilmente básicos (grupos amino primarios, secundarios y/o terciarios, por ejemplo, polietilamina). El método de separación puede usar, por ejemplo, poliestireno sulfonado como matriz, añadir los aminoácidos en solución ácida y hacer pasar un tampón de pH progresivamente creciente a través de la columna. Los aminoácidos se eluyen cuando el pH alcanza sus respectivos puntos isoelectrónicos. La cromatografía de interacción hidrófoba se puede emplear por el uso de cromatografía de fase inversa. Muchas columnas de sílice C8 y C18 disponibles comercialmente han demostrado una separación satisfactoria de péptidos en solución por el uso de un gradiente de elución.

En algunas realizaciones, las secuencias peptídicas que representan los ESB, las APS y los COB resultantes están diseñadas para mejorar la facilidad de detección. En algunos casos, las secuencias peptídicas se pueden diseñar para mejorar los patrones de fragmentación en un espectrómetro de masas. Es muy conocido en la técnica que la eficacia de fragmentación de un enlace en una secuencia peptídica depende de la secuencia (véase, por ejemplo, Tabb et al., *Anal Chem.* 2003 March 1; 75 (5): 1155 y Klammer et al., *Bioinformatics* 2008, 24: 348-356). Las eficacias de fragmentación dependientes de la secuencia se pueden emplear para diseñar secuencias peptídicas representativas con los patrones de fragmentación deseados.

En algunas realizaciones, las secuencias peptídicas que representan los ESB, las APS y los COB resultantes están diseñadas para conferir ciertas características físicas y químicas a las moléculas peptídicas. Por ejemplo, las secuencias peptídicas representativas se pueden diseñar para dar como resultado moléculas peptídicas con solubilidades en soluciones acuosas dentro de un intervalo deseado. Para otro ejemplo, las secuencias peptídicas representativas se pueden diseñar para dar como resultado moléculas peptídicas con un grado deseado de estructura secundaria o terciaria o la falta de las mismas. Para otro ejemplo adicional, las secuencias peptídicas representativas se pueden diseñar para dar como resultado moléculas peptídicas con enlaces disulfuro o la falta de los mismos. Para incluso un ejemplo adicional, las secuencias peptídicas representativas se pueden diseñar para dar como resultado moléculas peptídicas con características de unión deseadas a las dianas elegidas. Las secuencias de los ESB, los CL, las APS y los COB resultantes se pueden diseñar adicionalmente para explotar los tRNA especialmente cargados en un sistema de expresión de proteínas. Por consiguiente, se puede lograr la incorporación de aminoácidos no naturales a las moléculas peptídicas resultantes.

Diversas realizaciones se refieren a la separación de los COB ligados a los ESB o secuencias derivadas, tales como una secuencia peptídica, antes de la detección. En algunas realizaciones, la separación se basa en una propiedad físico-química adecuada de las moléculas. Estos tipos de separaciones son particularmente útiles para dirigir secuencialmente las moléculas a los detectores, aumentando así su abundancia relativa y la complejidad de la señal en el momento de la detección. Varias realizaciones comprenden la separación de las moléculas de una manera dirigida a las secuencias. Por ejemplo, todas las moléculas que comprenden un ESB particular se pueden aislar hibridando la secuencia de ESB con una secuencia suficientemente complementaria, purificando por afinidad utilizando una etiqueta unida específica de ESB, purificando por afinidad utilizando una secuencia derivada codificada por la secuencia de ESB o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Los métodos de separación se pueden dirigir también a un COB específico de célula o a una de sus porciones.

En algunas realizaciones, las construcciones que comprenden los ESB y los COB se someten a separación. Por ejemplo, las construcciones se pueden someter a una clasificación por purificación por gradiente o afinidad de acuerdo con los ESB. En algunas realizaciones, la separación puede comprender múltiples dimensiones, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más dimensiones. Por ejemplo, las construcciones se pueden separar clasificándolas de acuerdo con las primeras APS en una dimensión y clasificándolas de acuerdo con las segundas APS en otra dimensión y opcionalmente clasificándolas de acuerdo con los ESB en una tercera dimensión.

En algunas realizaciones, el método de separación comprende separación por gradiente, en un gel, usando un campo electromagnético y/o cualquier otro método de separación adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, las construcciones que comprenden los ESB y/o los COB se pueden separar antes de la detección. Por ejemplo, las construcciones se pueden separar de acuerdo con los ESB y después de la separación se pueden detectar los ESB y/o los COB en las construcciones. La detección puede ser detección por relación molar, detección enzimática, secuenciación, afinidad diferencial en un gradiente o gel, campo electromagnético, por ejemplo UV, fluorescencia o quimioluminiscencia, cualquier método de detección descrito en la presente memoria, o cualquier otro método de detección adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la separación comprende inmovilizar las construcciones. Por ejemplo, las construcciones se pueden inmovilizar en una superficie de matriz o en una perla. Una porción del ESB y/o COB se puede usar para inmovilizar las construcciones. El ESB y/o el COB se pueden detectar desde posiciones de inmovilización. En un ejemplo, los ESB y/o los COB que comprenden el oligonucleótido se pueden inmovilizar en una perla o micromatriz que está recubierta con oligonucleótidos complementarios.

a. Moléculas detectables o monómeros marcadores

Los COB de la presente invención se pueden marcar con cualquiera de una variedad de monómeros marcadores, tales como un radioisótopo, fluorocromo, colorante, enzima, nanopartícula, marcador quimioluminiscente, biotina u otro monómero conocido en la técnica que se pueda detectar directamente (por ejemplo, por emisión de luz) o indirectamente (por ejemplo, por unión de un anticuerpo marcado fluorescentemente). Generalmente, una o más de

las APS marcadas en el COB se marcan con uno o más monómeros marcadores, y las señales proporcionadas por los monómeros marcadores unidos a la APS de un COB constituyen un código detectable que identifica la diana a la que la UBA se une al COB. En ciertas realizaciones, la falta de una señal dada de la APS (por ejemplo, una mancha oscura) puede también constituir parte del código del COB.

5 Ejemplo de monómeros marcadores que se pueden usar con los COB descritos en la presente memoria y métodos para incorporar los monómeros marcadores en los COB están descritos en la patente de EE.UU. 7.473.767; las solicitudes de patentes de EE.UU. N° 10/542458; 12/324357; 11/645270 y 12/541131.

10 Cuando se añaden moléculas detectables o monómeros marcadores a los COB, además de las capacidades analíticas cualitativas proporcionadas por el COB de la invención y las técnicas analíticas basadas en ellas, el COB de la invención es especialmente adecuado para realizar análisis cuantitativos. Al proporcionar una unión de uno a uno entre el COB de la invención y sus moléculas diana en una muestra biomolecular, se pueden identificar y contar todas o una porción representativa de las moléculas diana presentes en la muestra. Este recuento individual de las diversas especies moleculares proporciona un método preciso y directo para determinar la concentración absoluta o relativa de la molécula diana en la muestra biomolecular. Además, la capacidad de abordar cada molécula en una mezcla individualmente aprovecha los beneficios de la miniaturización que incluyen alta sensibilidad, requisitos de una mínima cantidad de muestra, altas velocidades de reacción que son proporcionadas por la cinética de la fase de solución en un volumen pequeño, y en última instancia muy bajos costes de reactivos.

Moléculas diana

20 Las moléculas diana o epítomos son las moléculas detectadas o medidas por la unión de un UBA cuya(s) región(es) específica(s) de diana se reconocen. Los ejemplos de moléculas diana incluyen, aunque sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, moléculas pequeñas, monómeros orgánicos o fármacos. Los ácidos nucleicos que se pueden analizar por los métodos de la presente invención incluyen: DNA bicatenario, DNA monocatenario, horquillas de DNA monocatenario, híbridos DNA/RNA, RNA (por ejemplo, mRNA o miRNA) y horquillas de RNA. Solamente por conveniencia los métodos descritos en la presente memoria se explican principalmente en el contexto del análisis de proteínas o mRNA. Sin embargo, las realizaciones descritas en la presente memoria también se pueden usar para detectar dianas no proteínicas o que no son mRNA. En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un polipéptido, un oligopéptido, una proteína, una fosfoproteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, una molécula pequeña sintética, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido, un polisacárido, un lípido, un esteroide y un fosfolípido.

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

40 Las composiciones, métodos y kits descritos en la presente memoria también se pueden usar en una amplia variedad de aplicaciones para determinar la presencia de moléculas diana en una muestra. Por ejemplo, aunque sin limitación, las composiciones, métodos y kits son útiles para estudios farmacocinéticos, que incluyen, aunque sin limitación, metabolismo de fármacos, perfiles de ADME y estudios de toxicidad; validación de dianas para el descubrimiento de fármacos; evaluación de perfiles de expresión génica, evaluación de perfiles de expresión de proteínas; análisis de proteoma; estudios metabolómicos; estudios de modificación posterior a la traducción, que incluyen, aunque sin limitación, glicosilación, fosforilación, acetilación y modificación de aminoácidos, tales como la modificación de glutamato para formar gamma-carboxi-glutamato e hidroxilación de prolina para formar hidroxiprolina; análisis de niveles específicos de anticuerpos en suero o mucosa; evaluación de indicadores de diagnóstico de ácidos no nucleicos; detección de antígenos extraños; y similares.

50 En cierta realización, al menos un UBA, al menos un ESB, o tanto el UBA como el ESB comprenden al menos un anticuerpo, aptámero o peptido que reacciona específicamente con al menos una molécula diana. En ciertas realizaciones, al menos un UBA, al menos un ESB, o tanto el UBA como el ESB comprenden proteínas de unión que interactúan específicamente con al menos una molécula diana. En algunas realizaciones, el ESB comprende un resto enlazador común.

55 El experto en la técnica apreciará que los complejos moleculares y la al menos parte de los complejos moleculares descritos en la presente memoria se pueden detectar individualmente mientras están fijados o unidos a un sustrato o mientras están en solución, dependiendo entre otras cosas, de la naturaleza del complejo molecular específico o componente escindible y de la técnica SMD y el aparato de detección empleados.

Métodos

60 La presente descripción proporciona métodos para la detección y cuantificación de moléculas diana en muestras biomoleculares. En particular, la descripción proporciona unos UBA que se pueden unir a moléculas diana individuales. La descripción proporciona también el uso de los ESB y los COB (véase la Figura 2). A través de los códigos de ESB y COB, la unión de los UBA a las moléculas diana da como resultado la identificación de las

moléculas diana en células únicas. En algunas realizaciones, el complejo ESB/COB representa una cantidad de información que representa la molécula diana y la célula de origen (véase la Figura 1). También se proporcionan métodos para preparar y utilizar dichos UBA y/o ESB y COB.

5 En un aspecto, la invención proporciona métodos para identificar múltiples moléculas diana en cada célula de una población celular compleja y para retener información específica de la célula con respecto a dicha molécula diana. Por lo tanto, para cada célula se analiza la cantidad de cada molécula diana asociada con dicha célula. En algunas realizaciones, se determinan múltiples cantidades de información para identificar múltiples moléculas diana en cada célula de una población celular compleja.

10 En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para detectar al menos una molécula diana en una muestra que comprende las etapas: (a) proporcionar: (i) una población de células que comprende potencialmente al menos una molécula diana, (ii) un primer UBA específico para una primera molécula diana, (iii) un primer código de barras específico del epítipo (ESB) específico para una región del primer UBA, donde el ESB comprende un primer resto enlazador común, y (iv) una población de COB, donde la población de COB comprende un segundo resto enlazador común, donde el segundo resto enlazador es complementario del primer resto enlazador común en el primer ESB; (b) formar al menos un primer complejo que comprende la al menos una molécula diana, la primera sonda UBA y el primer ESB, donde la al menos una molécula diana se une al primer UBA y el ESB se une al UBA; (c) añadir la población de los COB, donde se forma un segundo complejo con al menos una molécula diana, la primera sonda UBA, el primer ESB y un primer COB, y donde el segundo resto enlazador común del primer COB se une al primer resto enlazador del primer ESB, y donde los COB de la población de los COB se asocian con una célula de la población de células; y (d) detectar el segundo complejo o al menos parte del tercer complejo.

15 En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para la detección y/o cuantificación de una molécula diana uniéndose un UBA a una molécula diana. Un UBA comprende al menos una porción de reacción que permite que el UBA se una o interaccione con la molécula diana; típicamente de una manera específica de secuencia o específica de conformación, o ambas; por ejemplo, aunque sin limitación, unión antígeno-anticuerpo, unión aptámero-diana y similares (véanse las Figuras 2 y 3).

20 En algunas realizaciones, los UBA pueden ser parte de al menos un conjunto de sondas, que comprenden al menos una primera sonda y al menos una segunda sonda. Por tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para la detección y/o cuantificación de una molécula diana uniéndose un conjunto de sondas UBA a una molécula diana, donde el conjunto de sondas UBA comprende una primera sonda UBA y una segunda sonda UBA. La primera sonda UBA y la segunda sonda UBA comprenden al menos una porción de reacción que permite que las sondas se unan o interaccionen con diferentes regiones de la molécula diana, por ejemplo, de una manera específica de secuencia, o una manera específica de conformación, o ambas. En algunas realizaciones, la sonda UBA y/o una segunda sonda UBA contienen una región de captura como se describe en la presente memoria.

25 En ciertas realizaciones, los UBA comprenden una porción de identidad o al menos parte de una porción de identidad, por ejemplo, un ESB, un COB, un ESB y/o un oligo enlazador. La porción de identidad permite la identificación de la presencia o ausencia de los UBA unidos a la molécula diana en la etapa de detección de los métodos descritos en la presente memoria. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para la detección y/o cuantificación de una molécula diana uniéndose el UBA a una molécula diana, donde el UBA contiene una porción de identidad (por ejemplo, un ESB, un COB, u ESB y/o un oligo enlazador)

30 En algunas realizaciones, la molécula diana se etiqueta indirectamente dentro de las células con un código de barras específico del epítipo (ESB). Cada ESB comprende un código único que se puede asociar a una molécula diana específica. Los ESB son moléculas o conjuntos que están diseñados para unirse con al menos un UBA o parte de un UBA; y pueden, bajo condiciones apropiadas, formar un complejo molecular que comprende el ESB, el UBA y la molécula diana. Los ESB comprenden al menos una porción de identificación de identidad que les permite unirse o interaccionar con al menos un UBA; típicamente de una manera específica de secuencia o específica de conformación, o ambas; por ejemplo, aunque sin limitación, unión UBA-anticuerpo, unión aptámero-diana y similares. En algunas realizaciones, los ESB se unen, directa o indirectamente, al UBA. En otras realizaciones, los ESB se unen a los UBA en una célula o muestra, por ejemplo, como parte del procedimiento de ensayo. En ciertas realizaciones, los UBA y/o los ESB comprenden una región de captura. En algunas realizaciones, la región de captura se usa para el aislamiento del UBA/ESB y/o la inmovilización del UBA/ESB en una superficie. La región de captura puede ser una etiqueta de afinidad, una perla, un portaobjetos o una matriz. En ciertas realizaciones, los ESB comprenden un resto enlazador común, por ejemplo, un oligo enlazador. En ciertas realizaciones, el oligo enlazador común es complementario de un oligo enlazador común en las subunidades polímeras analizables (APS) que forman el código de barras de origen de la célula (COB).

35 40 45 50 55 60 Las Figuras 3 y 4 muestran una representación esquemática de una de las realizaciones de la invención en la que se usa un método de síntesis por agrupamiento y división para agregar el COB al complejo molécula diana/UBA/ESB. La Figura 3 en la Etapa 1 muestra el marcaje de células con reactivos UBA-ESB-CL. El UBA proporciona la especificidad para que la molécula diana sea reconocida en una célula. En algunas realizaciones, el UBA puede ser un anticuerpo específico para un marcador de superficie como CD8, o un epítipo intracelular como un fosfo-epítipo en una quinasa tal como *Stat-3*. En algunas realizaciones, el UBA podría ser un DNA antisentido para un mRNA diana en una célula fijada. El UBA se identifica con un ESB que tiene un resto CL, siendo este último para la adición posterior de información de etiquetado específica de célula. La Figura 4 en la Etapa 2 muestra la iniciación de la

5 síntesis por agrupamiento y división. En este ejemplo, la población de células se divide en 20 tubos. Las poblaciones celulares se pueden dividir en pocillos, perlas o cualquier superficie adecuada conocida en la técnica. En la Etapa 3, se añade a cada tubo una unidad APS. La APS se une al complejo UBA/ESB a través de los CL complementarios en la APS y el ESB. En la Etapa 4, cada célula en un tubo dado tiene ahora agregado a cada par UBA-ESB la misma subunidad que la definida por los contenidos del tubo (uno de 1-20 APS en este ejemplo). Cada población dividida de la Etapa 3 tiene ahora una subunidad de polímero "etiqueta" de DAPS añadida a todos los DBAA en dicha célula. En la Etapa 5, las células de los 20 tubos se reúnen en un tubo. 1/20 de las células tienen la misma subunidad APS. En la Etapa 6, las etapas 2-4 se repiten para añadir una segunda APS a la APS anterior. En este ejemplo, las células en un tubo serán una mezcla de células, todas las cuales tienen la subunidad APS de la ronda 2 y una de las 20 APS usadas en la ronda 1 en una distribución estadísticamente igual. Por lo tanto, en la ronda 2 dentro de cada mezcla de tubos individuales, todos los polímeros se extienden por la adición de la misma APS. El proceso se repite según sea necesario. El epítipo/código de barras junto con la signatura de origen de la célula unida se lee por cualesquiera de los métodos conocidos en la técnica incluyendo los descritos en la presente memoria.

10 El número de rondas de agrupamiento y división requerido se define por el número de células en un ensayo y una estimación estadística de lo que daría una sobrerrepresentación del número de etiquetas que aseguran un COB único para cada célula. Esto viene dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Número de etiquetas requeridas} = \frac{\ln(1 - C)}{\ln(1 - \frac{1}{N})}$$

donde C = certeza de sobrerrepresentación y

20 donde N = número de células

Por lo tanto, si se tiene 1 millón de células y se desea una certeza del 99,9% de unicidad de etiquetas, se necesitan:

$$\frac{\ln(0,001)}{\ln(1 - \frac{1}{10^6})} = 6907751$$

25 es decir, aproximadamente 7 millones de etiquetas. En diversas realizaciones, una alta certeza de unicidad de etiquetas asegura una alta significación estadística para la identificación de células/partículas como entidades distintas. Sin estar vinculados a ninguna teoría, una alta certeza de unicidad de etiquetas proporciona una alta probabilidad de que dos marcadores COB idénticos se originaron de la misma célula/partícula.

30 Sin embargo, para 10^6 células, 7 millones de etiquetas significa que 1000 pares de células podrían ser marcadas como la "misma" célula. Por lo tanto, para tener solo una posibilidad de 1 en 10 hay un ÚNICO par de células duplicadas, la ecuación debe ser ajustada al 99,99999%

$$\frac{\ln(1 - 0,9999999)}{\ln(1 - \frac{1}{10^6})} = 16118087$$

Por lo tanto, se requieren 16 veces más etiquetas que células.

35 Para determinar el número de rondas dadas, un número dado de subunidades para la creación de códigos de barras:

$$x^y = T$$

da

$$y = \frac{\ln(T)}{\ln(x)}$$

40 Si se tuvieran 20 subunidades, para $1,7 \times 10^7$ etiquetas se necesitarían los siguientes ciclos de adición de APS:

$$\frac{\ln(17000000)}{\ln(20)} = 5,557$$

Esto se puede redondear hasta 6 ciclos de adición de APS.

45 Si se tuviera 100 subunidades, se necesitarían solo 3,6 rondas, o redondeando 4 ciclos de adición de APS.

Por lo tanto, en algunas realizaciones la invención proporciona métodos para etiquetar indirectamente moléculas diana dentro de las células con un ESB. La población de células se trata en un método de síntesis por agrupamiento y división que agrega al código de barras específico del epítipo una segunda signatura que indica la célula de

origen, o un código de barras del origen de la célula. Los UBA pueden ser anticuerpos, diacuerpos, etc., para proteínas, o etiquetas de DNA antisentido para RNA y DNA para ácidos nucleicos. El ESB puede ser un ácido nucleico legible por métodos de secuenciación de alto rendimiento o subunidades químicas analizables por métodos de espectrometría de masas. Los COB pueden ser ácidos nucleicos legibles por métodos de secuenciación de alto rendimiento o subunidades químicas analizables por métodos de espectrometría de masas.

Las APS pueden ser cadenas específicas de DNA o imitadores de DNA. Las APS se pueden unir por medio de ligasa. Los ejemplos de enzimas que se pueden usar para la ligación incluyen, aunque sin limitación, DNA ligasa y RNA ligasa, tales como DNA ligasa de T4, RNA ligasa de T4, ligasa de *Thermus thermophilus* (Tth), DNA ligasa de *Thermus aquaticus* (Taq) o ligasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu). La ligación química se puede realizar usando agentes activadores y reductores, tales como carbodiimida, bromuro de cianógeno (BrCN), imidazol, 1-metilimidazol/carbodiimida/cistamina, N-cianoimidazol, ditiotreitól (DTT) y luz ultravioleta. También están dentro del alcance de la invención técnicas de ligación, tales como la ligación de relleno de huecos, que incluyen, aunque sin limitación, OLA y LCR de relleno de huecos, ligación de oligonucleótidos por puenteo y ligación de corrección. Se pueden encontrar descripciones de estas técnicas, entre otros lugares, en la patente de EE.UU. 5.185.243, las solicitudes de patentes europeas publicadas EP 320308 y EP 439182 y las publicaciones PCT N° WO 90/01069 y WO 01/57268. Las APS se pueden extender por polimerasas.

Estas subunidades APS se pueden detectar por secuenciación completa de todas las etiquetas de DNA por cualesquiera métodos adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, Illumina HiSeq 2000, incluyendo los métodos de secuenciación descritos en la presente memoria.

Las APS pueden ser moléculas pequeñas según procedimientos de síntesis combinatoria o moléculas complejas construibles de pesos deterministas. Estas subunidades se pueden detectar por espectrometría de masas

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la información específica de células se ensambla por un UBA (código de barras para que se reconozca el epitopo) enlazado a su COB asociado (desde cuya célula se originó la información). (Véase la Figura 5).

En algunas realizaciones, los complejos UBA/ESB/COB se aíslan por una región de captura como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la región de captura se usa para la inmovilización de los complejos UBA/ESB/COB en una superficie.

En algunas realizaciones, la información de los UBA se puede amplificar antes del procedimiento del COB (agrupamiento y división) con cualquier método de amplificación adecuado conocido en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria, tales como los métodos de cadena de ramificación o de círculo rodante.

En algunas realizaciones, la corrección y detección de errores se puede codificar en subunidades. La idea general para lograr la detección y corrección de errores es añadir cierta redundancia (es decir, algunos datos adicionales) a un mensaje, que los receptores pueden usar para verificar la consistencia del mensaje entregado y para recuperar los datos que se determinó que eran erróneos. Los esquemas de detección y corrección de errores pueden ser sistemáticos o no sistemáticos: en un esquema sistemático, el transmisor envía los datos originales y añade un número fijo de bits de verificación (o datos de paridad), que se derivan de los bits de datos por algún algoritmo determinista. Si solo se requiere la detección de errores, un receptor puede simplemente aplicar el mismo algoritmo a los bits de datos recibidos y comparar su salida con los bits de verificación recibidos; si los valores no coinciden, ha ocurrido un error en algún momento durante la transmisión. En un sistema que usa un código no sistemático, el mensaje original es transformado en un mensaje codificado que tiene al menos tantos bits como el mensaje original. Los esquemas de detección y corrección de errores incluyen códigos de repetición, bits de paridad, sumas de verificación, verificaciones de redundancia cíclica (CRC), funciones *hash* criptográficas, códigos de corrección de errores, petición de repetición automática, ARQ híbrido, código de corrección de errores, códigos convolucionales, códigos de bloques, tales como códigos *hamming*, códigos de verificación de paridad multidimensionales, códigos de Reed-Solomon, códigos turbo y códigos de verificación de paridad de baja densidad (LDPC).

En algunas realizaciones, las cadenas en cada ronda están bloqueadas para una adición posterior si no se añadieron polímeros. Esto podría lograrse con DNA como unidades polímeras si cada ronda utiliza diferentes partes sobresalientes para adiciones complementarias.

En algunas realizaciones, el epitopo/código de barras junto con la signatura del origen de célula enlazada se lee por secuenciación usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria. La sensibilidad para el método de secuenciación suponiendo que cada lectura de 100 pb representa un par ESB-COB es la siguiente para las proteínas diana. Los números de copias de proteínas de las moléculas de interés varían de 100 a 100.000. Suponiendo que se quieran leer 100 proteínas con la siguiente distribución aproximada:

	Proteínas del ensayo 1	Lecturas del ensayo 1	Proteínas del ensayo 2	Lecturas del ensayo 2
100 copias	20	2×10^3	20	2×10^3
500 copias	20	1×10^4	20	1×10^4
1000 copias	20	2×10^4	20	2×10^4

	Proteínas del ensayo 1	Lecturas del ensayo 1	Proteínas del ensayo 2	Lecturas del ensayo 2
10000 copias	20	2×10^5	40	4×10^5
100000 copias	20	2×10^6	0	-

En el ensayo 1, será necesario poder leer 2.232.000 secuencias por célula para acceder luego a las 100 proteínas en una célula. Usando una técnica de secuenciación que puede realizar 2×10^9 lecturas, tal como *Illumina HiSeq 2000*, esto significa que el método puede leer 100 proteínas en ~1000 células. Sin embargo, si se limitan las proteínas de alto número de copias evitándolas por completo o "ocultando" su representación por normalización (varios métodos pueden funcionar para esto), se puede aumentar el número de células accesibles. Digamos, por lo tanto, que se normalizan y ocultan las 100.000 copias hasta un límite de 10.000 copias (Ensayo 2), luego el número total de lecturas es 432.000. Es decir, se pueden leer 100 proteínas en ~5000 células.

Para el mRNA los números son diferentes, ya que los RNA se expresan generalmente mucho menos. Los números de copias de RNA de las moléculas de interés varían de 5 a 1000 (basado en los números de los genes esenciales de Lewin); sin contar los mRNA especializados para la alta producción de proteínas como actina o Ig. Por lo tanto, suponiendo que se quiere leer 100 mRNA con la siguiente distribución aproximada:

	mRNA del ensayo 1	Lecturas del ensayo 1
5 copias	60	300
50 copias	20	1000
100 copias	10	1000
1000 copias	10	10000

En el ensayo 1, es necesario poder leer 12.300 secuencias por célula para acceder a todos los 100 mRNA en una célula. Usando una técnica de secuenciación que puede realizar 2×10^9 lecturas, tal como *Illumina HiSeq 2000*, esto significa que el método puede leer 100 mRNA en ~162.000 células. Esto es equivalente a un experimento de citometría de flujo con altos parámetros. 200 mRNA con la misma distribución se podrían modificar de escala linealmente para ser leídos en ~ 80.000 células.

Como será evidente para los expertos en la técnica, aumentar el número de lecturas aumentará el número de células y los parámetros accesibles (por ejemplo, los mRNA o proteínas).

Cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria se puede usar en la detección de múltiples moléculas diana. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos que comprenden UBA para el análisis de moléculas diana. En algunas realizaciones, la invención proporciona una población de UBA para uso en un ensayo multiplexado. Cada UBA de la población es específico para una molécula diana. La unión de las moléculas diana a los UBA se detecta luego usando pares ESB-COB. Cada par ESB-COB comprende un código de marcador único que se puede asociar a una molécula diana específica y a la célula de origen como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la detección del ESB-COB como se describe más adelante es de naturaleza digital en el sentido porque se cuenta una molécula una vez. Aunque la fluorescencia se utiliza para leer el código, las señales son altas y el punto está presente o no, por lo tanto, la detección es digital. Usar la detección digital en lugar de una señal fluorescente analógica utilizada para cuantificar la señal conduce a una cuantificación más precisa. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria permiten multiplexar a niveles más allá de los actualmente posibles, una cuantificación más precisa, y posiblemente una sensibilidad más alta.

Muestras biomoleculares

Los sistemas UBA y ESB/COB de la invención se pueden usar para detectar moléculas diana en cualquier muestra biomolecular. Como apreciarán los expertos en la técnica, la muestra puede comprender cualquier cantidad de cosas, incluyendo, aunque sin limitación: muestras biológicas, tales como células (incluyendo tanto células primarias como líneas celulares cultivadas), lisados celulares o extractos, tejidos y extractos de tejidos; fluidos corporales (incluyendo, aunque sin limitación, sangre, orina, suero, linfa, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, humor acuoso o vítreo, calostro, esputo, líquido amniótico, saliva, secreciones anales y vaginales, sudoración y semen, un trans-sudado, un exudado (por ejemplo, fluido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación) o fluido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad, tales como artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artritis séptica) de prácticamente cualquier organismo, prefiriéndose las muestras de mamíferos y siendo particularmente preferidas las muestras humanas; muestras ambientales (incluyendo, aunque sin limitación, muestras de aire, agrícolas, de agua y de suelo); muestras de agentes de guerra biológica; muestras de investigación que incluyen fluidos extracelulares, líquidos sobrenadantes extracelulares de cultivos celulares, cuerpos de inclusión en bacterias, compartimentos celulares, periplasma celular, compartimento de mitocondrias, etc.

Las muestras biomoleculares pueden proceder indirectamente de especímenes biológicos. Por ejemplo, cuando la molécula diana de interés es una proteína quinasa, la muestra biomolecular de la invención puede ser una muestra que contiene proteínas aisladas de un lisado celular. En otro ejemplo, la muestra biomolecular de la invención se genera sometiendo un espécimen biológico a fraccionamiento, por ejemplo, fraccionamiento por tamaños o fraccionamiento por membranas.

Los métodos de aislamiento de proteínas también son bien conocidos en la técnica y los kits que emplean al menos algunas de estas técnicas están disponibles comercialmente. Las técnicas de aislamiento de proteínas emplean típicamente una o más de las siguientes: maceración y lisis celular, que incluyen métodos físicos, químicos y enzimáticos; centrifugación; separaciones por peso molecular, tales como cromatografía de exclusión por tamaños y electroforesis preparativa; precipitación selectiva, por ejemplo, procedimientos de precipitación por adición de sal y por separación de sal; diversos métodos cromatográficos; y similares. Las descripciones detalladas y los protocolos relevantes para las técnicas de purificación de proteínas se pueden encontrar, entre otros lugares, en Marchak et al., *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Press (1996); *Essentials from Cells: A Laboratory Manual*, D. Spector and R. Goldman, eds., Cold Spring Harbor Press (2003); R. Simpson, *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (2003); y D. Liebler, *Introduction to Proteomics*, Humana Press (2002). También se pueden usar kits disponibles comercialmente, por ejemplo, aunque sin limitación, ProteoExtract™. *Partial Proteome Extraction Kits* (P-PEK) y ProteoExtract™. *Complete Proteome Extraction Kits* (C-PEK), disponibles de CALBIOCHEM®, La Jolla, CA. El experto en la técnica apreciará que los análisis de ácidos nucleicos para su uso con las composiciones, métodos y kits de la invención se pueden obtener fácilmente sin experimentación excesiva usando dichas técnicas de purificación y kits comerciales.

Las muestras biomoleculares de la invención pueden ser naturales, por ejemplo, no sometidas a manipulación o tratamiento, o estar tratadas, lo que puede incluir cualquier número de tratamientos, incluyendo la exposición a agentes candidatos que incluyen fármacos, ingeniería genética (por ejemplo, la adición o delección de un gen), etc.

Las muestras biomoleculares pueden incluir también muestras ambientales, como las que contienen bacterias u otros organismos, tales como diatomeas, dinoflagelados, algas, entre otros, como en ciertas muestras de origen marino o terrestre.

Detección de los COB

Los complejos COB/ESB se detectan por cualquier medio disponible en la técnica que sea capaz de detectar las secuencias o señales específicas de un complejo COB/ESB dado.

En algunas realizaciones se puede amplificar la información sobre los UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones. La amplificación se puede realizar por cualquier medio conocido en la técnica. En algunos casos, la información sobre los UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones se amplifican por la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los ejemplos de técnicas de PCR que se pueden usar incluyen, aunque sin limitación, PCR cuantitativa, PCR fluorescente cuantitativa (QF-PCR), PCR fluorescente múltiple (MF-PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR), PCR de una única célula, PCR de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (PCR-RFLP), PCR-RFLP/RT-PCR-RFLP, PCR de iniciación en caliente, PCR anidada, PCR *polony in situ*, amplificación por círculo rodante (RCA) *in situ*, PCR puente, PCR de picotitulación, PCR en emulsión. Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación con transcripción, replicación de secuencia autosostenida, amplificación selectiva de secuencias de polinucleótidos diana, reacción en cadena de polimerasa cebada con secuencia de consenso (CP-PCR), reacción en cadena de polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR), PCR cebada con oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR) y amplificación de secuencias basada en ácidos nucleicos (NABSA). Otros métodos de amplificación que se pueden usar en la presente invención incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. 5.242.794; 5.494.810; 4.988.617; y 6.582.938.

En cualquiera de las realizaciones, la amplificación de la información en los UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones puede ocurrir en una perla. En cualquiera de las realizaciones de la presente invención, los ácidos nucleicos diana se pueden obtener a partir de una única célula.

En cualquiera de las realizaciones de la presente invención, la información sobre los UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones puede ser pre-amplificada antes de la etapa de amplificación (por ejemplo, por PCR).

En algunas realizaciones, se cuantifican los UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones. Los métodos para cuantificar ácidos nucleicos son conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, cromatografía de gases, cromatografía de fluidos supercríticos, cromatografía de líquidos (incluyendo cromatografía de reparto, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía en capa fina y cromatografía de afinidad), electroforesis (incluida electroforesis capilar, electroforesis de zona capilar, isoelectroenfoque capilar, electrocromatografía capilar, cromatografía capilar electrocinética micelar, isotacoforesis, isotacoforesis transitoria y electroforesis en gel capilar), hibridación genómica comparativa (CGH), micromatrices,

matrices en perlas y genotipificación de alto rendimiento, tal como con el uso de la sonda de inversión molecular (MIP).

La cuantificación de los UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones se puede usar para determinar el número de genes y/o copias de alelos, el nivel de expresión de genes o exones, el análisis del estado de metilación, o la detección de un nuevo transcrito para diagnóstico o una afección, es decir, anomalía fetal o cáncer.

En algunas realizaciones se secuencian los UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones. La secuenciación se puede llevar a cabo por los métodos clásicos de secuenciación de Sanger que son bien conocidos en la técnica. La secuencia también se puede conseguir usando sistemas de alto rendimiento, algunos de los cuales permiten la detección de un nucleótido secuenciado inmediatamente después en el momento de su incorporación a una cadena en crecimiento, es decir, la detección de la secuencia en tiempo real o sustancialmente en tiempo real. En algunos casos, la secuenciación de alto rendimiento genera al menos 1000, al menos 5000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 30.000, al menos 40.000, al menos 50.000, al menos 100.000 o al menos 500.000 lecturas de secuencias por hora; siendo cada lectura al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 120 o al menos 150 bases por lectura.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por la máquina *HiSeq 2000* de Illumina. Esta máquina utiliza secuenciación basada en terminador reversible por síntesis química. Esta máquina puede hacer 200 mil millones de lecturas de DNA en ocho días.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por ABI Solid System. Esta plataforma de análisis genético permite la secuenciación masivamente paralela de fragmentos de DNA amplificados clonalmente enlazados a perlas. La metodología de secuenciación se basa en la ligación secuencial con oligonucleótidos marcados con colorante.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por Ion Torrent Personal Genome Machine (PMG). La PGM puede hacer 10 millones de lecturas en dos horas.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de tecnología disponible por Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, Massachusetts) tal como el método *Single Molecule Sequencing by Synthesis* (SMSS). El SMSS es único porque permite secuenciar el genoma humano completo en hasta 24 horas. Finalmente, el SMSS está descrito en parte en las solicitudes de patente de EE.UU. publicadas N° 20060024711; 20060024678; 20060012793; 20060012784; y 20050100932.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por 454 Lifesciences, Inc. (Branford, Connecticut) tal como el dispositivo *PicoTiterPlate* que incluye una placa de fibra óptica que transmite la señal quimioluminiscente generada por la reacción de secuenciación para ser registrada por un cámara CCD en el instrumento. Este uso de fibra óptica permite la detección de un mínimo de 20 millones de pares de bases en 4,5 horas.

Los métodos para usar la amplificación en perlas seguidos por detección de fibra óptica están descritos en Marguiles, M., et al., "*Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*", *Nature*, doi: 10.1038/nature03959; y así como en las solicitudes de patentes de EE.UU. publicadas N° 20020012930; 20030068629; 20030100102; 20030148344; 20040248161; 20050079510, 20050124022; y 20060078909.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento se realiza usando *Clonal Single Molecule Array* (Solexa, Inc.) o secuenciación por síntesis (SBS) utilizando química de terminador reversible. Estas tecnologías están descritas en parte en las Patentes de EE.UU. N° 6.969.488; 6.897.023; 6.833.246; 6.787.308; y en las solicitudes de patentes de EE.UU. publicadas N° 20040106110; 20030064398; 20030022207; y en el trabajo de Constans, A., *The Scientist* 2003, 17 (13):36.

En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento puede tener lugar utilizando AnyDot.chips (Genovox, Alemania). En particular, los AnyDot.chips permiten una mejora de 10x - 50x la detección de señal de fluorescencia de nucleótidos. Los AnyDot.chips y los métodos para usarlos están descritos en parte en las Solicitudes de Publicación Internacional N° WO 02088382, WO 03020968, WO 03031947, WO 2005044836, PCT/EP 05/05657, PCT/EP 05/05655; y en las solicitudes de patente alemanas N° DE 101 49 786, DE 102 14 395, DE 103 56 837, DE 10 2004 009 704, DE 10 2004 025 696, DE 10 2004 025 746, DE 10 2004 025 694, DE 10 2004 025 695, DE 10 2004 025 744, DE 10 2004 025 745 y DE 10 2005 012 301.

Otros sistemas de secuenciación de alto rendimiento incluyen los descritos en los trabajos de Venter, J., et al., *Science* 16 February 2001; Adams, M. et al., *Science* 24 March 2000; y M. J. Levene, et al. *Science* 299: 682-686, January 2003; así como en las solicitudes de patentes de EE.UU. publicadas N° 20030044781 y 2006/0078937. En general, dicho sistema implica la secuenciación de una molécula de ácido nucleico diana que tiene una pluralidad de bases por la adición temporal de bases mediante una reacción de polimerización que se mide en una molécula de ácido nucleico, es decir, se sigue en tiempo real la actividad de una enzima polimerizante de ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico molde que ha de ser secuenciada. La secuencia puede ser deducida luego identificando qué base se está incorporando en la cadena complementaria en crecimiento del ácido nucleico diana por la actividad

5 catalítica de la enzima polimerizante del ácido nucleico en cada etapa de la secuencia de adiciones de bases. Se proporciona una polimerasa en el complejo de molécula de ácido nucleico diana en una posición adecuada para moverse a lo largo de la molécula de ácido nucleico diana y extender el cebador oligonucleotídico en un sitio activo. Se proporciona una pluralidad de tipos marcados de análogos de nucleótidos próximos al sitio activo, siendo cada tipo distinguible de análogo de nucleótido complementario de un nucleótido diferente en la secuencia de ácido nucleico diana. La cadena de ácidos nucleicos en crecimiento se extiende utilizando la polimerasa para añadir un análogo de nucleótido a la cadena de ácidos nucleicos en el sitio activo, donde el análogo de nucleótido que se está añadiendo es complementario del nucleótido del ácido nucleico diana en el sitio activo. Se identifica el análogo de nucleótido añadido al cebador oligonucleotídico como resultado de la etapa de polimerización. Se repiten las etapas de proporcionar análogos de nucleótidos marcados, polimerizar la cadena de ácido nucleico en crecimiento e identificar el análogo de nucleótido añadido de modo que la cadena de ácidos nucleicos se extienda más y se determine la secuencia del ácido nucleico diana.

10 En algunas realizaciones, el análisis de secuencia del UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones puede incluir una secuenciación con cuatro colores por esquema de ligación (ligación degenerada) que implica hibridar un cebador de anclaje a una de las cuatro posiciones. A continuación, se lleva a cabo una reacción de ligación enzimática del cebador de anclaje a una población de nonúmeros degenerados que están marcados con colorantes fluorescentes. En cualquier ciclo dado, la población de nonúmeros que se utiliza tiene tal estructura que la identidad de una de sus posiciones está correlacionada con la identidad del fluoróforo unido a dicho nonúmero. En la medida en que la ligasa discrimina por la complementariedad en esa posición consultada, la señal fluorescente permite la inferencia de la identidad de la base. Después de realizar la ligación y la formación de imágenes de cuatro colores, se eliminan los complejos cebador de anclaje:nonúmero y comienza un nuevo ciclo. Los métodos para visualizar información de secuencia después de realizar la ligación son conocidos en la técnica.

15 Uno o más UBA, ESB, COB, los complejos UBA/ESB, los complejos UBA/ESB/COB, los complejos COB/ESB y/o una de sus combinaciones se pueden detectar y/o cuantificar por cualquier método que detecte y/o cuantifique la presencia del complejo de detección ensamblado de interés. Tales métodos pueden incluir radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), inmunohistoquímica, histoquímica inmunofluorescente con o sin microscopía confocal, espectroscopía Raman, autorradiografía de rayos X, radiografía de rayos X, espectrometría de luminiscencia, ensayos de fase inversa, inmunoensayos enzimáticos homogéneos, y técnicas no enzimáticas relacionadas, transferencias de Western, tinción de células completas, inmunomicroscopía electrónica, amplificación de ácidos nucleicos, matriz de genes, matriz de proteínas, espectrometría de masas, fijación de membranas (denominada en inglés *patch clamp*), electroforesis en gel bidimensional, electroforesis en gel de presentación diferencial, ensayos de múltiples proteínas basados en microesferas, ensayos celulares sin marcadores y citometría de flujo, etc. La Patente de EE.UU. N° 4.568.649 describe sistemas de detección de ligandos, que emplean recuento por centelleo. Estas técnicas son particularmente útiles para los parámetros de proteína modificados. Las lecturas de células para proteínas y otros determinantes celulares se pueden obtener usando moléculas indicadoras fluorescentes o etiquetadas de otro modo. Los métodos de microscopía son útiles para medir parámetros en un contexto morfológico. Los métodos de citometría de flujo son útiles para medir parámetros intracelulares

20 Cuando se usan componentes marcados fluorescentemente en los métodos y composiciones de la presente invención, se reconocerá que se pueden usar para practicar la invención diferentes tipos de sistemas de monitorización fluorescente, por ejemplo, sistemas de dispositivos de medición citométrica. En algunas realizaciones, se usan sistemas de citometría de flujo o sistemas dedicados a cribado de alto rendimiento, por ejemplo placas de microtitulación de 96 pocillos o mayores, por ejemplo, Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press (1983); Herman, B., *Resonance Energy Transfer Microscopy* en *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology*, vol. 30, ed. Taylor, D. L. & Wang, Y. L., San Diego: Academic Press (1989), pp. 219-243; Turro, N. J., *Modern Molecular Photochemistry*, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. (1978), pp. 296-361. Cuando el complejo COB/ESB está marcado fluorescentemente, se puede investigar la consideración adecuada de fuentes de excitación apropiadas. Las posibles fuentes pueden incluir, aunque sin limitación, lámpara de arco, lámpara de xenón, láseres, diodos emisores de luz o alguna de sus combinaciones. La fuente de excitación apropiada se usa junto con un sistema de detección óptica apropiado, por ejemplo, un microscopio fluorescente invertido, un microscopio epi-fluorescente o un microscopio confocal. Preferiblemente, se usa un microscopio que pueda permitir la detección con suficiente resolución espacial para determinar la secuencia de las manchas en los complejos COB/ESB, si, por ejemplo, los complejos COB/ESB están marcados con tres colores diferentes, Alexa 488, Cy3 y Alexa 647 (marcados 1, 2 y 3, respectivamente). Los colores 1, 2 y 3 se adquieren cada uno en diferentes canales y el primer y segundo registros, que se pueden ver como filas de manchas, se desplazan en varios píxeles para poder mostrar cada registro individualmente. Los ejemplos de métodos para la detección de múltiples colores que se pueden usar en los métodos de la invención están descritos en la patente de EE.UU. N° 7.473.767, la solicitud de patente publicada de EE.UU. N° 2007/0166708, la solicitud de patente de EE.UU. N° 11/645270 y la solicitud PCT N° US06/049274.

25 La fluorescencia en una muestra se puede medir usando un fluorímetro. También se pueden usar otros métodos de detección de fluorescencia, por ejemplo, métodos de puntos cuánticos (véase, por ejemplo, Goldman et al., *J. Am.*

Chem. Soc. (2002) 124: 6378-82; Pathak et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123: 4103-4; y Remade et al., *Proc. Natl. Sci. USA* (2000) 18: 553-8) así como microscopía confocal.

En algunas realizaciones, se usa un clasificador de células por FACS (por ejemplo, FACSVantage™, LSRII, o Canto Cell Sorter, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) para clasificar y recoger células basándose en la presencia o ausencia de un complejo COB/ESB. Al impartir una carga electromagnética a gotitas que contienen las células positivas, dichas células se pueden separar de otras células. Las células seleccionadas positivamente se pueden cosechar en recipientes de recolección estériles. Estos procedimientos de clasificación celular están descritos en detalle, por ejemplo, en *FACSVantage™. Training Manual*, con referencia particular a los apartados 3-11 a 3-28 y 10-1 a 10-17, que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad para los instrumentos anteriores.

En otra realización, las células positivas se pueden clasificar usando separación magnética de células basándose en la presencia de un complejo COB/ESB. En tales técnicas de separación, las células que se han de seleccionar positivamente se ponen primero en contacto con un complejo COB/ESB que comprende partículas recuperables (por ejemplo, partículas sensibles magnéticamente). La célula se puede separar luego físicamente de células no positivas o no marcadas, por ejemplo, usando un campo magnético. Cuando se usan partículas sensibles magnéticamente, las células positivas o marcadas pueden ser retenidos en un envase usando un campo magnético mientras se eliminan las células negativas. Estos y otros procedimientos de separación similares están descritos, por ejemplo, en el manual de entrenamiento de Baxter Immunotherapy Isolex.

En algunas realizaciones, una o más células están contenidas en un pocillo de una placa de 96 pocillos u otra placa de múltiples pocillos disponible comercialmente. En una realización alternativa, la mezcla de reacción o las células están en un dispositivo de medición citométrica. Otras placas de múltiples pocillos útiles en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, placas de 384 pocillos y placas de 1536 pocillos. Incluso otros envases para contener la mezcla de reacción o células y útiles en la presente invención serán evidentes para el experto en la técnica.

En algunas realizaciones, la abundancia de un complejo COB/ESB se mide usando un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Un UBA que ha sido marcado con un elemento específico se une al complejo COB/ESB. Cuando la célula se introduce en el ICP, se atomiza e ioniza. Se mide la composición elemental de la célula, incluido el complejo COB/ESB. La presencia e intensidad de las señales correspondientes a los marcadores en el complejo COB/ESB indica la abundancia de los complejos COB/ESB en dicha célula (Tanner et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, (2007), 62 (3): 188-195).

En algunas realizaciones, el "citómetro de flujo" es un dispositivo para microfluidos donde las mediciones de células, o algunas de las mediciones de los contenidos de la célula, se llevan a cabo en canales diseñados para dirigir las células más allá de los dispositivos de detección en conjuntos paralelos de canales múltiples. Véanse las Patentes de EEUU. N° 7.378.280; 7.294.503; 7.294.298; y 6.830.936.

En algunas realizaciones, las células, o alguna porción de su contenido, se encapsulan por ultrasonidos dentro de gotitas individuales de líquido y se analizan con dispositivos de detección diseñados para medir las características de cada gotita individual y los materiales dentro de dichas gotitas.

Equipos y programas informáticos flexibles permiten la adaptabilidad del instrumento para múltiples aplicaciones. Los módulos del programa informático permiten la creación, modificación y ejecución de métodos. Los módulos de diagnóstico del sistema permiten la alineación de los instrumentos, las conexiones correctas y las operaciones motrices. Las herramientas personalizadas, el material de laboratorio y los patrones de transferencia de líquidos, partículas, células y organismos permiten que se realicen diferentes aplicaciones. Las bases de datos permiten el almacenamiento de métodos y parámetros. Las interfaces robóticas y de ordenador permiten la comunicación entre instrumentos.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención incluyen el uso de componentes de manipulación de líquidos. Los sistemas de manipulación de líquidos pueden incluir sistemas robóticos que comprenden cualquier número de componentes. Además, cualquiera o todas las etapas descritas en la presente memoria pueden ser automatizadas; así, por ejemplo, los sistemas pueden estar total o parcialmente automatizados.

Como apreciarán los expertos en la técnica, existe una amplia variedad de componentes que se pueden usar, que incluyen, aunque sin limitación, uno o más brazos robóticos; manipuladores de placas para el posicionamiento de microplacas; manipuladores automáticos de tapa o cubierta para quitar y reemplazar tapas de pocillos en placas de contaminación no cruzada; conjuntos de punta para distribución de muestras con puntas desechables; conjuntos de punta lavables para distribución de muestras; bloques de carga de 96 pocillos; gradillas para reactivos refrigeradas; posiciones de pipeta de placas de pipetas de microtitulación (opcionalmente enfriadas); torres de apilamiento para placas y puntas; y sistemas de ordenador.

Los sistemas totalmente robóticos o de microfluidos incluyen la manipulación automática de líquidos, partículas, células y organismos, incluido el pipeteo de alto rendimiento para realizar todas las etapas de las aplicaciones de cribado. Esto incluye manipulaciones de líquidos, partículas, células y organismos tales como aspiración, dispensación, mezclamiento, dilución, lavado, transferencias volumétricas precisas; recuperación y desecho de puntas de pipeta; y pipeteo repetitivo de volúmenes idénticos para suministros múltiples a partir de una única

aspiración de muestra. Estas manipulaciones son transferencias exentas de contaminación cruzada de líquidos, partículas, células y organismos. Este instrumento realiza la replicación automatizada de muestras de microplacas a filtros, membranas y/o placas secundarias, transferencias de alta densidad, diluciones en serie de placas completas y operación de alta capacidad.

5 En algunas realizaciones, se usan partículas, placas, cartuchos, tubos, partículas magnéticas u otra matriz de fase sólida derivatizados químicamente con especificidad para los componentes del ensayo. En esta invención son útiles las superficies de unión de microplacas, tubos o matrices de fase sólida incluyen superficies no polares, superficies altamente polares, recubrimiento con dextrano modificado para promover la unión covalente, recubrimiento con anticuerpos, medios de afinidad para unir proteínas o péptidos de fusión, proteínas fijadas en superficies, tales como
10 proteína A o G recombinante, resinas o recubrimientos de nucleótidos, y otra matriz de afinidad.

En algunas realizaciones, plataformas para placas de multi-pocillos, multi-tubos, soportes, cartuchos, minitubos, levitación y encapsulación por ultrasonidos, placas de pocillos profundos, tubos de microcentrifuga, crioviales, placas de pocillos cuadrados, filtros, chips, chips de microcanales, chips de microfluidos, fibras ópticas, perlas y otras matrices de fase sólida o plataforma con varios volúmenes se acomodan en una plataforma modular actualizable para capacidad adicional. Esta plataforma modular incluye un agitador orbital de velocidad variable y bancos de trabajo de múltiples posiciones para muestras de origen, dilución de muestras y reactivos, placas de ensayo, depósitos de muestras y de reactivos, puntas de pipeta y una estación de lavado activo. En algunas realizaciones, los métodos de la invención incluyen el uso de un lector de placas.,
15

En algunas realizaciones se usan sistemas de termociclador y termorregulación para estabilizar la temperatura de intercambiadores de calor, tales como bloques o plataformas controladas para proporcionar un control preciso de la temperatura de las muestras de incubación de 0°C a 100°C.
20

En algunas realizaciones, las cabezas de pipetas intercambiables (de uno o varios canales) con sondas magnéticas únicas o múltiples, sondas de afinidad o pipetadores manipulan de forma robotizada el líquido, las partículas, las células y los organismos. Los separadores o plataformas magnéticas de multi-pocillos o multi-tubos manipulan líquidos, partículas, células y organismos en formatos de muestra única o múltiple.
25

En algunas realizaciones, la instrumentación incluirá un detector, que puede ser una amplia variedad de detectores diferentes, dependiendo de los marcadores y el ensayo. En algunas realizaciones, los detectores útiles incluyen uno o varios microscopios con múltiples canales de fluorescencia; lectores de placas para proporcionar detección espectrofotométrica fluorescente, ultravioleta y visible con capacidad de punto final y cinética de longitud de onda simple y doble, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), luminiscencia, extinción, excitación de dos fotones y redistribución de intensidad; cámaras CCD para capturar y transformar datos e imágenes en formatos cuantificables; y una estación de trabajo informática.
30

En algunas realizaciones, el aparato robótico incluye una unidad de procesamiento central que se comunica con una memoria y un conjunto de dispositivos de entrada/salida (por ejemplo, teclado, ratón, monitor, impresora, etc.) a través de un bus. De nuevo, como se describe a continuación, esto puede ser además de o en lugar de la CPU para los dispositivos de multiplexación de la invención. La interacción general entre una unidad de procesamiento central, una memoria, dispositivos de entrada/salida y un bus es conocida en la técnica. Por lo tanto, una variedad de procedimientos diferentes, según los experimentos que se ejecutarán, se almacenan en la memoria de la CPU.
35

Estos sistemas robóticos de manipulación de fluidos pueden utilizar cualquier número de reactivos diferentes, incluidos tampones, reactivos, muestras, líquidos de lavado, componentes de ensayo tales como sondas marcadoras, etc.
40

Aplicaciones para la detección de moléculas diana

Las composiciones y los métodos de la invención se pueden usar para fines de diagnóstico, pronóstico, terapéuticos, estratificación de pacientes, desarrollo de fármacos, selección de tratamiento y cribado. La presente invención proporciona la ventaja de que se pueden analizar de una sola vez muchas moléculas diana diferentes a partir de una única muestra biomolecular utilizando los métodos de la invención. Esto permite, por ejemplo, realizar varios ensayos de diagnóstico en una muestra.
45

La composición y los métodos de la invención se pueden usar en proteómica. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionarán típicamente una respuesta rápida que es muy deseable para esta aplicación. Los métodos y la composición descritos en la presente memoria se pueden usar en el proceso de encontrar biomarcadores que se puedan usar para diagnósticos o pronósticos y como indicadores de salud y enfermedad. Los métodos y la composición descritos en la presente memoria se pueden usar para cribar fármacos, por ejemplo, desarrollo de fármacos, selección de tratamientos, determinación de la eficacia de tratamientos y/o identificar dianas para el desarrollo farmacéutico. La capacidad de analizar la expresión de proteínas en los ensayos de cribado que implican fármacos es muy importante debido a que las proteínas son el producto génico final en el cuerpo. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria medirán simultáneamente tanto las proteínas como la expresión de genes que proporcionará la mayor información con respecto al cribado particular que se realiza.
50
55

La composición y los métodos de la invención se pueden usar en análisis de expresión génica. Los métodos descritos en la presente memoria discriminan entre secuencias de nucleótidos. La diferencia entre las secuencias de nucleótidos diana puede ser, por ejemplo, una diferencia de bases de un solo ácido nucleico, una delección de ácido nucleico, una inserción de ácido nucleico o una transposición. Se pueden detectar también dichas diferencias de secuencias que implican más de una base. En algunas realizaciones, los UBA, por ejemplo, la sonda oligonucleotídica, tienen sustancialmente la misma longitud, de modo que se hibridan con las secuencias de nucleótidos diana en condiciones de hibridación sustancialmente similares. Como resultado, el proceso de la presente invención es capaz de detectar enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas y cáncer. También es útil en la monitorización ambiental, análisis forense y ciencia de los alimentos. Los ejemplos de análisis genéticos que se pueden realizar sobre ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo detección de SNP, detección de STR, análisis de expresión de RNA, metilación de promotores, expresión génica, detección de virus, sub-tipificación viral y resistencia a fármacos.

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

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se usan en el diagnóstico de una afección. Como se usa en la presente memoria, el término "diagnóstico" o "diagnóstico" de una afección incluye predecir o diagnosticar la afección, determinar la predisposición a la afección, monitorizar el tratamiento de la afección, diagnosticar una respuesta terapéutica de la enfermedad y el pronóstico de la afección, progreso de la afección y respuesta al tratamiento particular de la afección. Por ejemplo, una muestra de sangre se puede analizar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para determinar la presencia y/o cantidad de marcadores de una enfermedad o tipo de célula maligna en la muestra, diagnosticando o clasificando así una enfermedad o un cáncer.

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

Numerosas enfermedades y trastornos inmunológicos, proliferativos y malignos son especialmente sensibles a los métodos descritos en la presente memoria. Las enfermedades y los trastornos inmunológicos incluyen enfermedades y trastornos alérgicos, trastornos de la función inmunitaria y enfermedades y afecciones autoinmunitarias. Las enfermedades y trastornos alérgicos incluyen, aunque sin limitación, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, asma alérgica, eccema atópico, dermatitis atópica y alergia a alimentos. Las inmunodeficiencias incluyen, aunque sin limitación, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), síndrome hipereosinofílico, enfermedad granulomatosa crónica, deficiencia de adhesión de leucocitos I y II, síndrome de hiper IgE, Chediak Higashi, neutrofilias, neutropenias, aplasias, agammaglobulinemia, síndromes de hiper IgM, síndromes de DiGeorge/Velocardio-facial y defectos en la vía gamma-TH1 del interferón. Los trastornos por desregulación autoinmunitaria e inmunitaria incluyen, aunque sin limitación, artritis reumatoide, diabetes, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, oftalmopatía de Graves, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, psoriasis, esclerosis sistémica, bocio y estroma linfomatoso sistémica (tiroiditis de Hashimoto, bocio linfadenóide), alopecia aerata, miocarditis autoinmunitaria, liquen esclerótico, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, gastritis atrófica, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa y enfermedad inflamatoria intestinal, rechazo de aloinjertos y destrucción de tejidos por reacciones alérgicas a microorganismos infecciosos o a antígenos ambientales.

Las enfermedades y trastornos proliferantes que se pueden evaluar por los métodos de la invención incluyen, aunque sin limitación, hemangiomas en recién nacidos; esclerosis múltiple progresiva secundaria; enfermedad mielodegenerativa progresiva crónica; neurofibromatosis; ganglioneuromatosis; formación de queloides; enfermedad de Paget de los huesos; enfermedad fibroquística (por ejemplo, de la mama o el útero); sarcoidosis; enfermedad de Peyronie y fibrosis de Duputren, cirrosis, aterosclerosis y reestenosis vascular.

Las enfermedades y trastornos malignos que se pueden evaluar por los métodos de la invención incluyen tanto neoplasias malignas hematológicas como tumores sólidos.

Las neoplasias malignas hematológicas son especialmente adecuadas para los métodos de la invención cuando la muestra es una muestra de sangre, debido a que dichas neoplasias malignas implican cambios en las células llevadas por la sangre. Dichas neoplasias malignas incluyen linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfomas no de linfocitos B y otros linfomas, leucemias agudas o crónicas, policitemias, trombocitemias, mieloma múltiple, trastornos mielodisplásicos, trastornos mieloproliferantes, mielofibrosis, linfoproliferaciones inmunitarias atípicas y trastornos de células plasmáticas.

Los trastornos de células plasmáticas que se pueden evaluar por los métodos de la invención incluyen mieloma múltiple, amiloidosis y macroglobulinemia de Waldenström.

Ejemplo de tumores sólidos incluyen, aunque sin limitación, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, tumores cerebrales, tumores del sistema nervioso central, tumores de vejiga, melanomas, cáncer

de hígado, osteosarcoma y otros cánceres de huesos, carcinomas testicular y ovárico, tumores de cabeza y cuello, y neoplasmas cervicales.

Las enfermedades genéticas también se pueden detectar por el proceso de la presente invención. Esto se puede realizar por cribado prenatal o posnatal de anomalías cromosómicas y genéticas o enfermedades genéticas.

5 Ejemplos de enfermedades genéticas detectables incluyen: deficiencia de 21-hidroxilasa, fibrosis quística, síndrome de X frágil, síndrome de Turner, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de Down u otras trisomías, enfermedad cardíaca, enfermedades de un solo gen, tipificación de HLA, fenilcetonuria, anemia de células falciformes, enfermedad de Tay-Sachs, talasemia, síndrome de Klinefelter, enfermedad de Huntington, enfermedades autoinmunitarias, lipodosis, defectos de obesidad, hemofilia, errores congénitos del metabolismo y diabetes.

10 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para diagnosticar infecciones por patógenos, por ejemplo, infecciones por bacterias y virus intracelulares, determinando en la muestra la presencia y/o cantidad de marcadores de bacterias o virus, respectivamente.

Por el proceso de la presente invención se puede detectar una amplia variedad de enfermedades infecciosas. Típicamente, estas son causadas por agentes infecciosos bacterianos, virales, parasitarios y fúngicos. También se puede determinar usando la presente invención la resistencia de diversos agentes infecciosos a los fármacos.

15 Los agentes infecciosos bacterianos que se pueden detectar por la presente invención incluyen *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klesbiella*, *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium aviumintracellulare*, *Yersinia*, *Francisella*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Clostridia*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *B-Hemolytic strep.*, *Corynebacteria*, *Legionella*,
20 *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Hemophilus influenza*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Treponema palladium*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, patógenos de *Rickettsial*, *Nocardia* y *Acitnomyces*.

Los agentes infecciosos fúngicos que se pueden detectar por la presente invención incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*,
25 *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Phycomycetes (Rhizopus)*, *Sporothrix schenckii*, *Chromomycosis* y *Maduromycosis*.

Los agentes infecciosos virales que se pueden detectar por la presente invención incluyen virus de la inmunodeficiencia humana, virus linfocitotrófico de linfocitos T humanos, virus de la hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C), virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus de papiloma humano, ortomixovirus, paramixovirus, adenovirus, coronavirus, rhabdovirus, poliovirus, togavirus, bunyavirus, arenavirus, virus de la rubeola y reovirus.

Los agentes parásitos que se pueden detectar por la presente invención incluyen *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malaria*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Onchoverva volvulus*, *Leishmania*, *Trypanosoma spp.*,
35 *Schistosoma spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium*, *Giardia spp.*, *Trichomonas spp.*, *Balantidium coli*, *Wuchereria bancrofti*, *Toxoplasma spp.*, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Dracunculus medinensis*, tremátodos, *Diphyllobothrium latum*, *Taenia spp.*, *Pneumocystis carinii* y *Necator americanis*.

La presente invención también es útil para la detección de resistencia a fármacos por agentes infecciosos. Por ejemplo, se pueden identificar con la presente invención *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos y virus de la inmunodeficiencia humana resistente a AZT.

Por lo tanto, las moléculas diana detectadas usando las composiciones y métodos de la invención pueden ser marcadores de pacientes (tales como un marcador de cáncer) o marcadores de infección con un agente extraño, tales como marcadores bacterianos o virales.

45 Debido a la naturaleza cuantitativa de los UBA/ESB/COB, las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para cuantificar moléculas diana cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o afección, por ejemplo, marcadores sanguíneos que están sobre-regulados o sub-regulados como resultado de un estado morbo.

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

Kits

La descripción proporciona además kits que comprenden uno o más componentes de la invención. Los kits pueden comprender, por ejemplo, uno o más UBA, uno o más ESB y/o una o más APS. Los kits se pueden usar para cualquier propósito evidente para los expertos en la técnica, incluidos los descritos anteriormente.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona también kits útiles para la extensión y la inmovilización selectiva de los COB, UBA, ESB y/o una de sus combinaciones. Los kits pueden comprender un sustrato para inmovilización y una o más parejas de unión para facilitar la extensión o la inmovilización de un COB, UBA, ESB y/o

una de sus combinaciones. Las parejas de unión podrían comprender, en ciertas realizaciones, un resto útil para la extensión de los COB, UBA, ESB y/o una de sus combinaciones, con una fuerza apropiada. En ciertas realizaciones, las parejas de unión podrían facilitar la inmovilización o la inmovilización selectiva a la superficie de los COB, UBA, ESB y/o una de sus combinaciones. En realizaciones adicionales, los kits podrían comprender un dispositivo capaz de extender los COB, UBA, ESB y/o una de sus combinaciones.

Los kits pueden contener una población de COB, APS, UBA, ESB y/o una de sus combinaciones como se describe en la presente memoria.

Los kits pueden contener APS previamente marcadas o APS no marcadas con uno o más componentes para marcar las APS. Además, los ESB y/o las APS dispuestos en un kit pueden tener o no UBA pre-unidos. En una realización, los UBA están dispuestos en el kit no unidos a los ESB y/o las APS.

Los kits pueden comprender otros reactivos, tales como oligos enlazadores y oligos de puente. En algunas realizaciones, los kits pueden separar los UBA en diferentes premezclas.

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

Los kits también incluirán instrucciones para usar los componentes del kit, y/o para preparar y/o usar los APS, COB, UBA y ESB.

Ejemplos

Ejemplo predictivo 1 - Preparación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con métodos estándares conocidos en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden sintetizar en un sintetizador de DNA 394A (Applied Biosystems Division of Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA).

Los oligonucleótidos se purifican por precipitación con etanol después de desprotección durante una noche a 55°C. Las porciones específicas de cebador de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR se purifican por electroforesis en gel de poliacrilamida en geles de acrilamida al 10%/urea 7M. Los oligonucleótidos se visualizan después de la electroforesis por oscurecimiento UV contra una pantalla iluminada y se escinden del gel (Applied Biosystems Inc., 1992). Luego se eluyen durante una noche a 64°C en tampón TNE (es decir, EDTA Tris-sodio) (Tris/HCl 100 mM, pH 8,0 que contiene NaCl 500 mM y EDTA 5 mM) y se recuperan del eluato usando cartuchos Sep Pak (Millipore Corp, Milford, Mass.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos se vuelven a poner en suspensión en 100 µL de TE (es decir, Tris/HCl 10 mM, pH 8,0 que contiene EDTA 1 mM). Las concentraciones típicas de estas soluciones de oligonucleótidos originales son aproximadamente 1 µg/µL o aproximadamente 74 pm/µL.

[Como un requisito previo para las reacciones de ligación, los oligonucleótidos se fosforilan con la polinucleótido-quinasa de T4 en el extremo 5'. Se combinan partes alícuotas de los oligonucleótidos equivalentes a 200 pm con 10 µL de tampón de quinasa 10x (Tris/HCl 500 mM, pH 8,0, MgCl₂ 100 mM), 10 µL de ATP 10 mM, 20 U de quinasa de T4 y suficiente agua-ME para obtener un volumen final de 100 µL. La fosforilación se lleva a cabo a 37°C durante 30 minutos seguido de incubación durante 10 minutos a 85°C para inactivar la enzima de T4.

Las soluciones de los oligonucleótidos se ajustan a concentraciones convenientes. La solución de oligonucleótido tratada con quinasa se diluye cuatro veces en agua para producir una concentración de 1000 fm/µL. Se prepara una solución de los oligonucleótidos combinando volúmenes de los oligonucleótidos equivalentes a 200 pm con agua suficiente para obtener un volumen final de 400 µL. Esto crea una solución de 1000 fm/µL de cada uno de los oligonucleótidos. Se congelan partes alícuotas (20 µL) de los oligonucleótidos tratados con quinasa y no tratados con quinasa para uso posterior.

Método general para la síntesis y purificación de oligonucleótidos por *química clic*

Se sintetizan oligonucleótidos como se ha descrito en el trabajo de El-Sagheer et al., (PNAS, 108: 28, 11338-11343, 2011). Descrito brevemente, las DNA-fosforamiditas estándares, los soportes sólidos y los reactivos adicionales se adquieren a Link Technologies y Applied Biosystems. Los oligonucleótidos se sintetizan en un sintetizador de DNA/RNA automatizado 394 de Applied Biosystems usando un ciclo de fosforamidita con 0,2 o 1,0 µmol estándar de destrilación catalizada por ácido, acoplamiento, protección de extremos y oxidación con yodo. Todos los monómeros de β-cianoetil-fosforamidita se disuelven en acetonitrilo anhidro hasta una concentración de 0,1 M inmediatamente antes de su uso. El tiempo de acoplamiento para los monómeros A, G, C y T normales es 35 segundos, mientras que el tiempo de acoplamiento para las amiditas inversas es 180 segundos. El monómero de alquino-fosforamidita (2c en la Figura 2, El-Sagheer et al., PNAS, 108: 28, 11338-11343, 2011) y otros monómeros no estándares se acoplan durante 360 segundos. La escisión de los oligonucleótidos del soporte sólido y la desprotección se logra mediante la exposición a una solución acuosa concentrada de amoníaco durante 60 minutos a temperatura ambiente seguido por calentamiento en un tubo herméticamente cerrado durante 5 horas a 55°C. Los oligonucleótidos se purifican por HPLC de fase inversa en un sistema Gilson usando una columna XBridge™ BEH300 Prep C18 10 µM 10x250 mm (Waters) con un gradiente de acetonitrilo en acetato de amonio (tampón B 0% a 50% durante 30 minutos, caudal 4 mL/min), tampón A: acetato de amonio 0,1 M, pH 7,0, tampón B: acetato de

amonio 0,1 M, pH 7,0, con acetonitrilo al 50%. La elución se controla por absorción UV a 305 o 295 nm. Después de la purificación por HPLC, los oligonucleótidos se desalinizan usando columnas NAP-10 y se analizan por electroforesis en gel.

i) Síntesis de oligonucleótidos con 3'-alquino

5 La síntesis de oligonucleótidos con 3'-alquino se realiza como se describe en el trabajo de El-Sagheer et al., (PNAS, 108: 28, 11338-11343, 2011). Descrito brevemente, los oligonucleótidos con 3'-alquino se sintetizan usando el monómero de 3'-propargiltimidina-fosforamidita 2c y ensamblando la secuencia requerida en la dirección 5' a 3' usando el 3'-O-(4,4'-dimetoxitritil)desoxirribonucleósido-5'-fosforamiditas de A, G, C y T (fosforamiditas inversas, *Link Technologies*) o por la unión de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-propargil-5-metil-deoxicitidina a un soporte sólido (carga 33 µmol/g, poliestireno AM, *Applied Biosystems*) según El-Sagheer et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (35): 15329-15334). La resina se envasa en una columna de torsión (*Glen Research*), luego se usa para ensamblar la secuencia requerida en la dirección 3' a 5' por síntesis estándar de oligonucleótidos de fosforamidita. Luego los oligonucleótidos se escinden, desprotegen y purifican tal como se ha descrito anteriormente.

ii) Síntesis de oligonucleótidos con 5'-azida

15 La síntesis de oligonucleótidos con 5'-azida se realiza como se ha descrito en el trabajo El-Sagheer et al., (PNAS, 108: 28, 11338-11343, 2011). Descrito brevemente, los oligonucleótidos se ensamblan en la escala de 0,2 o 1,0 µmol (sin tritilo) como se describe en el método general (anteriormente) con 5'-HO-dC, 5'-HO-dT normales (o con 5'-yodo-dT usando el monómero 5'-yodo-dT disponible comercialmente de *Glen Research*). Para convertir el grupo 5'-hidroxilo en 5'-yodo, los oligómeros protegidos fijados en la columna de síntesis se tratan con una solución 0,5 M de yoduro de metiltrifenoxifosfonio en DMF (1,0 mL), que se hace pasar periódicamente a través de la columna por medio dos jeringas de 1 mL durante 15 minutos a temperatura ambiente. La columna se lava luego varias veces con DMF anhidro. Para convertir el 5'-yodo (dT o dC) en 5'-azido (dT o dC), la azida sódica (50 mg) se pone en suspensión en DMF anhidro (1 mL), se calienta durante 10 minutos a 70°C y luego se enfría y el líquido sobrenadante recogido en una jeringa de 1 mL, se pasa hacia adelante y hacia atrás a través de la columna y luego se deja a la temperatura ambiente durante una noche (o durante 5 horas a 55°C). La columna se lava luego con DMF y acetonitrilo y se seca por el paso de una corriente de gas argón. El oligonucleótido con 5'-azida resultante se escinde del soporte sólido, se desprotege y se purifica como se ha descrito anteriormente.

iii) Síntesis de oligonucleótidos con 3'-alquino-5'-azida

30 .]La síntesis de oligonucleótidos con 3'-alquino-5'-azida se realiza como se ha descrito en trabajo de El-Sagheer et al., (PNAS, 108: 28, 11338-11343, 2011), Descrito brevemente, 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-propargil-5-metildesoxicitidina en soporte sólido de poliestireno se envasa en una columna de torsión (*Glen Research*) y se usa para ensamblar la secuencia requerida en la dirección 3' a 5' (síntesis estándar de oligonucleótidos de fosforamidita) con 5'-yodo-dT, 5'-HO-dT o 5'-HO-dC en el extremo 5'. Los grupos 5'-hidroxilo o yodo se convierten a continuación en azida usando las condiciones descritas anteriormente para la síntesis de los oligonucleótidos con 5'-azida.

35 **Ejemplo predictivo 2. Ligación por química clic**

Los oligonucleótidos APS se aparean con un molde y se mantienen durante la noche a 4°C. Se prepara una solución de catalizador *clic* Cu¹ a partir del ligando *tris*-hidroxipropiltriaazol como se ha descrito en Chan et al., (Chan TR, Hilgraf R, Sharpless KB, & Fokin VV (2004) *Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. Org. Lett.* 6 (17): 2853-2855; 2,8 µmol en NaCl 0,2 M, 38,0 µL), ascorbato sódico (4,0 µmol en NaCl 0,2 M, 8,0 µL) y CuSO₄.5H₂O (0,4 µmol en NaCl 0,2 M, 4,0 µL). Esta solución se añade a los oligonucleótidos apareados y la mezcla de reacción se mantiene a 0°C durante 1 hora, luego a temperatura ambiente durante 1 hora más. Los reactivos se eliminan usando una columna de filtración en gel NAP-25.

Ejemplo predictivo 3. Síntesis por agrupamiento y división de COB en perlas

45 En este ejemplo, los COB se sintetizan unidos a perlas. Se utilizan 4 métodos diferentes para el ensamblaje de las APS en los COB:

COB en mosaico (Figura 6)

50 Perlas de aminometil-poliestireno macroporoso (MPPS) se marcan con diez oligonucleótidos CL diferentes, cada uno con una primera región complementaria opcional del cebador de amplificación, una de 10 secuencias de ESB diferentes y una región de apareamiento común. Se realizan seis rondas de síntesis por agrupamiento y división. En cada ronda, las perlas se dividen en 20 recipientes diferentes. A cada recipiente se añade un oligonucleótido APS diferente, en total 20 APS diferentes. Cada APS en una ronda dada comprende además una secuencia de subcódigo única que es diferente del resto de las APS en esa ronda.

55 En la primera ronda, cada APS comprende una región de apareamiento 1 que es complementaria de la región de apareamiento del oligonucleótido CL en un extremo y una región de apareamiento 2 en el otro extremo. Tras la adición, el oligonucleótido APS se hibrida al oligonucleótido CL a lo largo de la región de apareamiento complementaria 1. La región de apareamiento 2 permanece monocatenaria y está disponible para la hibridación con una APS añadida en la ronda siguiente. En rondas posteriores, cada APS comprende en un extremo una región de apareamiento complementaria de la región de apareamiento disponible de la APS de la ronda anterior y en el otro

extremo una región de apareamiento adicional. La APS añadida se hibrida a la APS añadida en la ronda anterior a lo largo de la región de apareamiento complementaria.

La última subunidad comprende opcionalmente una segunda región complementaria del cebador de amplificación para hibridación de cebadores de PCR o de secuenciación.

- 5 Un CL, o una o más APS comprenden además una región de etiqueta aleatoria, que actúa como un contador molecular como se ha descrito antes, permitiendo la posterior normalización de los COB detectados.

Tras la adición de una APS en cada ronda, las perlas se agrupan y se dividen en 20 nuevas agrupaciones iniciando la ronda siguiente. Se añade un nuevo conjunto de 20 APS en cada ronda con un par de regiones de apareamiento específicas de ronda como se ha descrito anteriormente. Después de la adición de 6 APS, las APS hibridadas en las perlas se unen como parches usando una polimerasa/ligasa. Los COB se amplifican opcionalmente por PCR para secuenciación usando cebadores que se dirigen a las regiones complementarias del cebador de amplificación en el CL y la última subunidad APS

10

Unión de COB usando apareamiento específico de cebadores (Figura 7)

15 Perlas de aminometil-poliestireno macroporoso (MPPS) se marcan con diez oligonucleótidos CL diferentes, cada uno con una primera región complementaria opcional del cebador de amplificación, una de 10 secuencias de ESB diferentes y una región de apareamiento común. Se realizan seis rondas de síntesis por agrupamiento y división. En cada ronda, las perlas se dividen en 20 recipientes diferentes. A cada recipiente se añade un oligonucleótido APS diferente, en total 20 APS diferentes. Cada APS en una ronda dada comprende además una secuencia de subcódigo única que es diferente del resto de las APS en esa ronda.

20 También se añade un cebador de apareamiento. En la primera ronda, el cebador de apareamiento tiene una región complementaria del oligonucleótido CL y una región complementaria de la APS. El cebador de apareamiento se hibrida con ambos, uniéndolos. En rondas posteriores, el cebador de apareamiento tiene una región complementaria de la APS añadida durante la ronda anterior y una región complementaria de la APS que se añade en la ronda actual. Similarmente, el cebador de apareamiento se hibrida con las APS de rondas posteriores uniéndolas. Las regiones complementarias del cebador de apareamiento son específicas de cada ronda, lo que permite una hibridación eficaz de las subunidades solo a partir de las rondas anterior y actual. De acuerdo con esto, el cebador de apareamiento no se hibrida con subunidades de rondas anteriores, que no tendrían regiones complementarias del cebador de apareamiento de una ronda actual, bloqueando así la síntesis adicional de subunidades que carecen de COB de rondas particulares.

25

30 La última subunidad comprende opcionalmente una segunda región complementaria del cebador de amplificación para hibridación de cebadores de PCR o secuenciación.

Un CL o una o más APS comprenden además una región de etiqueta aleatoria, que actúa como un contador molecular como se ha descrito antes, permitiendo la posterior normalización de los COB detectados.

35 Tras la adición de una APS y un cebador de apareamiento en cada ronda, las perlas se agrupan y dividen en 20 nuevos grupos iniciando la ronda siguiente. Se añade en cada ronda un nuevo conjunto de 20 APS con un par de regiones de apareamiento específicas de ronda como se describió anteriormente. Después de la adición de 6 APS, las APS hibridadas en las perlas se unen permanentemente utilizando una polimerasa/ligasa o utilizando *química clic* como se describe en *Ejemplo 2*. Los COB se amplifican opcionalmente por PCR para secuenciación usando cebadores que se dirigen a las regiones complementarias del cebador de amplificación en el CL y la última subunidad APS.

40

Unión de COB usando apareamiento de cebadores con regiones complementarias comunes (Figura 8)

45 Perlas de aminometil-poliestireno macroporoso (MPPS) se marcan con diez oligonucleótidos CL diferentes, cada uno con una primera región complementaria opcional del cebador de amplificación, una de 10 secuencias de ESB diferentes y una región de apareamiento común. Se realizan seis rondas de síntesis por agrupamiento y división. En cada ronda, las perlas se dividen en 20 recipientes diferentes. A cada recipiente se añade un oligonucleótido APS diferente, en total 20 APS diferentes. Cada APS en una ronda dada comprende además una secuencia de subcódigo única que es diferente del resto de las APS en esa ronda.

50 También se añade un cebador de apareamiento. En la primera ronda, el cebador de apareamiento tiene una primera región complementaria del oligonucleótido CL y una segunda región complementaria de la APS que se añade en la ronda actual. El cebador de apareamiento se hibrida con ambas uniéndolas. En rondas posteriores, el cebador de apareamiento tiene una primera región complementaria de la APS añadida durante la ronda anterior y una segunda región complementaria de la APS que se añade en la ronda actual. Similarmente, el cebador de apareamiento se hibrida con las APS de rondas posteriores uniéndolas. De las dos regiones complementarias del cebador de apareamiento, las primeras regiones complementarias son específicas de cada ronda, lo que permite una hibridación eficaz con subunidades solo de la ronda anterior. De acuerdo con esto, el cebador de apareamiento no se hibrida con subunidades de rondas anteriores, que no tendrían regiones complementarias del cebador de apareamiento de una ronda actual, bloqueando así la síntesis adicional de subunidades que carecen de COB de rondas particulares.

55

La última subunidad comprende opcionalmente una segunda región complementaria de cebador de amplificación para hibridación de cebadores de PCR o secuenciación.

Un CL o una o más APS comprenden además una región de etiqueta aleatoria, que actúa como un contador molecular como se describe antes, permitiendo la posterior normalización de los COB detectados.

- 5 Tras la adición de una APS y un cebador de apareamiento en cada ronda, las perlas se agrupan y dividen en 20 nuevos grupos iniciando la ronda siguiente. Se añade a cada ronda un nuevo conjunto de 20 APS con un par de regiones de apareamiento específicas de ronda como se describió anteriormente. Después de la adición de 6 APS, las APS hibridadas en las perlas se unen de forma permanente utilizando una polimerasa/ligasa o utilizando *química clic* como se describe en *Ejemplo 2*. Los COB se amplifican opcionalmente por PCR para secuenciación usando
10 cebadores que se dirigen a las regiones complementarias del cebador de amplificación en el CL y la última subunidad APS.

COB en bucles (Figura 9)

- 15 Perlas de aminometil-poliestireno (MPPS) macroporoso se marcan con diez oligonucleótidos CL diferentes, cada uno con una primera región complementaria opcional del cebador de amplificación, una de 10 secuencias de ESB diferentes, seis pares de regiones de apareamiento en bucle específicas de APS y una segunda región complementaria opcional del cebador de amplificación. Se realizan seis rondas de síntesis por agrupamiento y división. En cada ronda, las perlas se dividen en 20 recipientes diferentes. Se añade a cada recipiente un oligonucleótido APS diferente, en total 20 APS diferentes. Cada APS en una ronda dada comprende además una secuencia de subcódigo única que es diferente del resto de las APS en esa ronda.

- 20 Las APS están diseñadas para hibridarse con el CL en una geometría de bucle, hibridándose en cada extremo con el CL a lo largo de las regiones de apareamiento en bucle específicas de la ronda. La hibridación puebla las APS a lo largo del CL, que luego se enlazan. Las APS están diseñadas de manera que no se hibridan eficazmente con el CL a lo largo de las regiones de apareamiento en bucle específicas de otras rondas. En consecuencia, si falta una APS de una ronda particular, las APS no se pueden enlazar entre sí correctamente, dependiendo del proceso de enlace.
25 Alternativamente, se sintetiza un COB con una APS ausente, cuya ubicación está flanqueada por un par de regiones de apareamiento en bucle. Por consiguiente, se puede analizar el COB resultante y se puede descartar o se puede procesarse alternativamente la información recuperada.

Un CL o una o más APS comprenden además una región de etiqueta aleatoria, que actúa como un contador molecular como se describe antes, permitiendo la posterior normalización de los COB detectados.

- 30 Tras la adición de una APS y un cebador de apareamiento en cada ronda, las perlas se agrupan y se dividen en 20 nuevos grupos iniciando la ronda siguiente. Se añade a cada redonda un nuevo conjunto de 20 APS con un par de regiones de apareamiento específicas de ronda como se describió anteriormente. Después de la adición de 6 APS, las APS hibridadas en las perlas se unen permanentemente utilizando una polimerasa/ligasa o *utilizando química clic* como se describe en *Ejemplo 1*. Los COB se amplifican opcionalmente por PCR para secuenciación usando
35 cebadores que se dirigen a las regiones complementarias del cebador de amplificación en el CL.

Enlace COB-ESB libre de polimerasa (Figura 10)

- 40 Perlas de aminometil-poliestireno (MPPS) macroporoso se marcan con diez oligonucleótidos CL diferentes, cada uno con un par de regiones de apareamiento en bucle específicas para una de las 10 secuencias de ESB en bucle diferentes y seis pares de regiones de apareamiento en bucle específicas de APS. Se añaden las 10 secuencias de ESB en bucle para aparearse con la porción específica de ESB en bucle del CL en una geometría de bucle. Las secuencias del ESB en bucle están diseñadas para minimizar el apareamiento no específico con el resto de las regiones específicas del ESB en bucle de los CL. Las secuencias de ESB en bucle comprenden una primera región complementaria opcional de cebador de amplificación, una secuencia de ESB y un par de regiones de apareamiento suficientemente complementarias con las regiones de apareamiento en bucle específicas de ESB en bucle en el CL.
45 Se realizan seis rondas de síntesis por agrupamiento y división. En cada ronda, las perlas se dividen en 20 recipientes diferentes. Se añade a cada recipiente un oligonucleótido APS, en total 20 APS diferentes. Cada APS en una ronda dada comprende además una secuencia de subcódigo única que es diferente del resto de las APS en esa ronda. Las APS en la ronda final comprenden además opcionalmente una segunda región complementaria del cebador de amplificación.

- 50 Las APS se diseñan para hibridarse con el CL en una geometría de bucle, hibridándose en cada extremo con el CL a lo largo de las regiones de apareamiento en bucle específicas de la ronda. La hibridación puebla las APS a lo largo del CL, que luego se enlazan entre sí. Las APS se diseñan de manera que no se hibriden eficazmente con el CL a lo largo de las regiones de apareamiento en bucle específicas de otras rondas. En consecuencia, si falta una APS de una ronda particular, las APS no se pueden enlazar entre sí correctamente, dependiendo del proceso de enlace.
55 Alternativamente, se sintetiza un COB con un APS ausente, cuya ubicación está flanqueada por un par de regiones de apareamiento en bucle. Por consiguiente, se puede analizar luego el COB resultante y se puede descartar o se puede procesar alternativamente la información recuperada.

Un CL o una o más APS comprenden además una región de etiqueta aleatoria, que actúa como un contador molecular como se describe antes, permitiendo la posterior normalización de los COB detectados.

Tras la adición de una APS y un cebador de apareamiento a cada ronda, las perlas se agrupan y se dividen en 20 nuevos agrupamientos iniciando la ronda siguiente. Se añade a cada ronda un nuevo conjunto de 20 APS con un par de regiones de apareamiento específicas de ronda como se describió anteriormente. Después de la adición de 6 APS, las APS hibridadas en las perlas se unen permanentemente usando *química clic* como se describe en *Ejemplo 2*. Los COB se amplifican opcionalmente por PCR para la secuenciación usando cebadores que se dirigen a las regiones complementarias del cebador de amplificación en el CL y la última subunidad APS.

Ejemplo predictivo 4. Detección por secuenciación de ácidos nucleicos

Los COB unidos a los ESB ensamblados resultantes de cualquiera de los métodos del *Ejemplo 3* se secuencian por la máquina *HiSeq 2000* de Illumina. Las secuencias resultantes comprenden al menos una de 10 secuencias de ESB diferentes, una región de etiqueta aleatoria y una combinación de 6 subcódigos que se originan a partir de las APS añadidas a esa perla particular durante las 6 rondas de síntesis por agrupamiento y división.

Ejemplo predictivo 5. Detección por secuenciación de péptidos (Figura 11)

Se sintetizan los COB enlazados a ESB usando cualquiera de los métodos de *Ejemplo 3*. Las secuencias resultantes comprenden un promotor de T7, un sitio de iniciación SP6, un codón de iniciación, un ESB, un COB y opcionalmente una región que codifica una etiqueta His (6) (Figura 11) El promotor de T7 y el sitio de iniciación SP6 se pueden incorporar en la secuencia enlazada al ESB, usando el mismo método que se usa para incorporar el ESB. Alternativamente, estas secuencias se pueden incorporar en la última APS. Opcionalmente, se puede incorporar una región de codificación de etiqueta His (6) enlazada a la APS final o al ESB.

Los COB enlazados a los ESB ensamblados se transcriben y traducen en secuencias peptídicas usando el *Expressway™ Maxi Cell-Free E. coli Expression System* (Invitrogen). Las secuencias peptídicas se aíslan usando cromatografía de afinidad y/o HPLC antes de ser secuenciadas usando un espectrómetro de masas en tándem.

Ejemplo predictivo 6. Síntesis por agrupamiento y división de COB en superficies de células

Los receptores de la superficie celular en las líneas celulares de leucocitos (HL60, JY y U937) se detectan y se cuantifican usando la síntesis por agrupamiento y división de los COB en superficies de células. Utilizando el *Antibody-Oligonucleotide All-in-One Conjugation Kit* (Solulink), se conjugan anticuerpos contra CD1, CD3, CD8 y CD4 con oligonucleótidos CL modificados con amina descritos en el *Ejemplo 3*. Los anticuerpos marcados individualmente se aíslan usando cromatografía de afinidad usando oligonucleótidos complementarios que se dirigen a una secuencia de oligonucleótidos CL y se verifica el número de marcadores en cada anticuerpo usando espectrometría de masas. Una suspensión de células de 10⁷ células se incuba con la combinación de los anticuerpos en condiciones adecuadas seguido por 6 rondas de síntesis por agrupamiento y división. Los COB enlazados a ESB resultantes se detectan como se describe en *Ejemplo 3* o el *Ejemplo 4*. Las señales detectadas relacionadas con los ESB enlazados a COB se cuantifican para cada combinación de COB. La coexpresión de cada uno de los antígenos CD1, CD3, CD8 y CD4 en las células se representa gráficamente por parejas. El análisis de componentes principales se utiliza para identificar las correlaciones más fuertes en los perfiles de expresión.

Ejemplo predictivo 7. Síntesis por agrupamiento y división de COB en células

Se enfría metanol a -20°C. Un cultivo celular que comprende 10⁷ células HeLa se cultiva usando condiciones adecuadas de cultivo de tejidos conocidas en la técnica. El medio de cultivo se retira por aspiración. Las células se fijan inmediatamente y se permeabilizan por la adición de 50 mL de metanol frío. Las células se dejan incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación suave. El metanol se retira cuidadosamente por aspiración. Las células se lavan con 100 mL de PBS 1X, tres veces.

Las células se bloquean con 150 mL de solución de caseína al 0,1% en PBS al 0,2% durante 1,5 horas a temperatura ambiente por agitación suave. Anti-caspasa-3 escindida de conejo, anti-phos-p38 de conejo, anti-phos-ERK2 de conejo, anti-ERK2 de ratón y anti-β-tubulina de ratón (clon AA2) se conjugan con CL como se describe en el *Ejemplo 5*. Las células se incuban con los anticuerpos conjugados con CL durante una noche a 4°C, agitando suavemente. Las células se lavan 5 veces con PBS 1X + Tween-20 al 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de 6 rondas de síntesis por agrupamiento y división.

Los COB enlazados a los ESB resultantes se detectan como se describe en el *Ejemplo 3* o el *Ejemplo 4*. Las señales detectadas relacionadas con los ESB enlazados a COB se cuantifican para cada combinación de COB. La coexpresión de cada uno de los phospho-p53, ERK1 en las células se representa por parejas gráficamente. El análisis de los componentes principales se utiliza para identificar las correlaciones más fuertes en los perfiles de expresión.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una pluralidad de moléculas diana en una muestra que comprende una pluralidad de células, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) unir a las moléculas diana en la pluralidad de células una pluralidad de etiquetas, en donde una etiqueta comprende un agente de unión única (UBA) que es específico para una de las moléculas diana, y un código de barras específico del epítipo (ESB) que comprende un código que representa la identidad de la molécula diana; y
- 10 (b) añadir posteriormente múltiples subunidades polímeras analizables (APS) a cada una de las etiquetas unidas en la pluralidad de células de manera ordenada durante las sucesivas rondas de síntesis por agrupamiento y división para crear códigos de barras de origen de la célula (COB) únicos que representan las identidades de células individuales a las que las están unidas las etiquetas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que para la etapa de unión no se necesita ni la separación ni el aislamiento de las células individuales.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además detectar los códigos de identidad de las moléculas diana y los códigos de barras de origen de la célula, en los para la etapa de detección no se necesita ni la separación ni aislamiento de las células individuales.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada molécula diana es una proteína o un ácido nucleico.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión única (UBA) comprende un anticuerpo.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que: i) el código de barras específico del epítipo (ESB) comprende un enlazador común (CL); y/o ii) el código de barras específico del epítipo (ESB) comprende un ácido nucleico.
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que i) cada subunidad polímera analizable (APS) es una unidad de codificación detectablemente distinta; y/o ii) en el que una subunidad polímera analizable (APS) o el código de barras específico del epítipo (ESB) comprende una región de unión al cebador de amplificación; y/o iii) en donde las subunidades polímeras analizables (APS) comprenden ácidos nucleicos.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los códigos de barras de origen de la célula (COB) comprenden una pluralidad de diferentes subunidades polímeras analizables (APS).
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que i) las múltiples subunidades polímeras analizables (APS), el código de barras específico del epítipo (ESB) y el agente de unión única (UBA) están enlazados por ligación; o ii) en el que las subunidades polímeras analizables (APS) múltiples, el código de barras específico del epítipo (ESB) y/o el agente de unión única (UBA) pueden ser enlazados por *química clic*; y/o iii) en el
- 35 que el agente de unión única (UBA), el código de barras específico del epítipo (ESB) o la subunidad polímera analizable (APS) pueden proporcionar moldes para la adición de cualquiera de uno de los otros UBA, ESB o APS.
10. Una composición que comprende un complejo entre:
- a) una molécula diana;
- 40 b) un agente de unión única (UBA) que es específico de la molécula diana;
- c) un código de barras específico del epítipo (ESB) dependiente de UBA y
- d) un código de barras de origen de la célula (COB) que comprende una pluralidad de subunidades polímeras analizables (APS) ordenadas en donde es detectable el orden de las APS.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde las subunidades polímeras analizables (APS), los códigos de barras específicos del epítipo (ESB), los enlazadores comunes (CL) o los códigos de barras de
- 45 origen de la célula (COB) ensamblados comprenden además una región de etiqueta aleatoria que funciona como un contador molecular para la enumeración del número de moléculas diana detectadas para una célula dada.

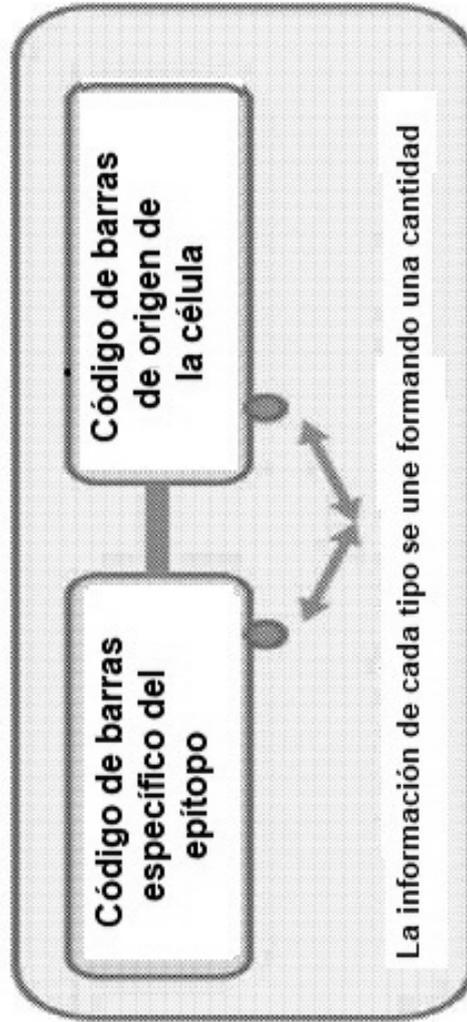
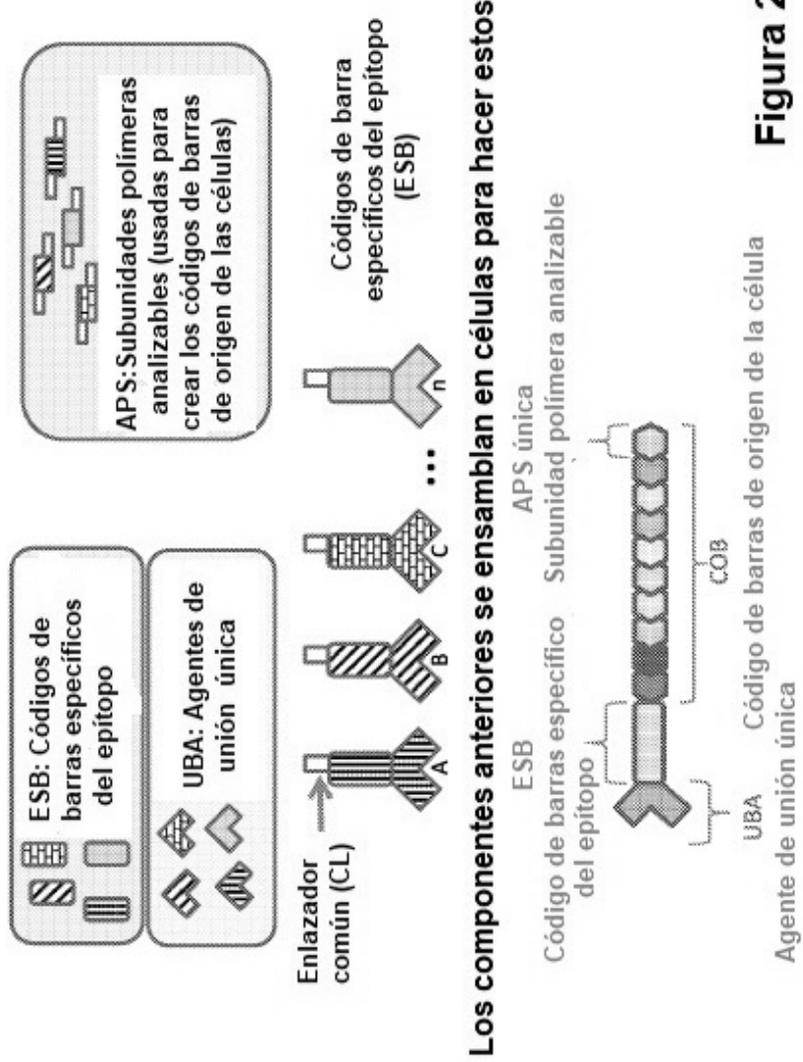


Figura 1



Los componentes anteriores se ensamblan en células para hacer estos

Figura 2

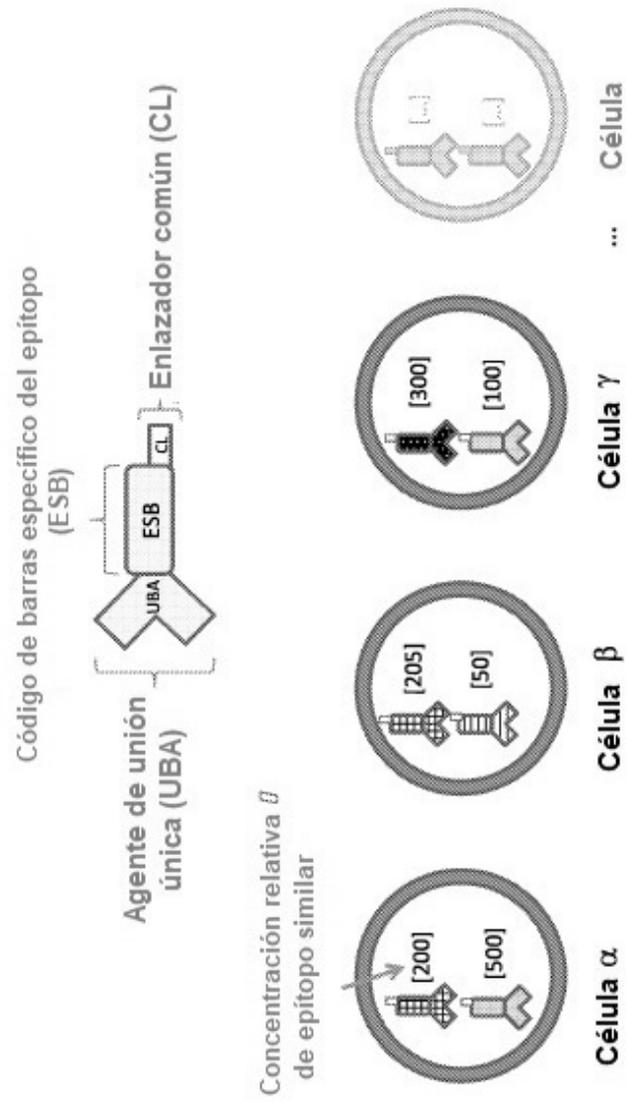


Figura 3

Ronda 1

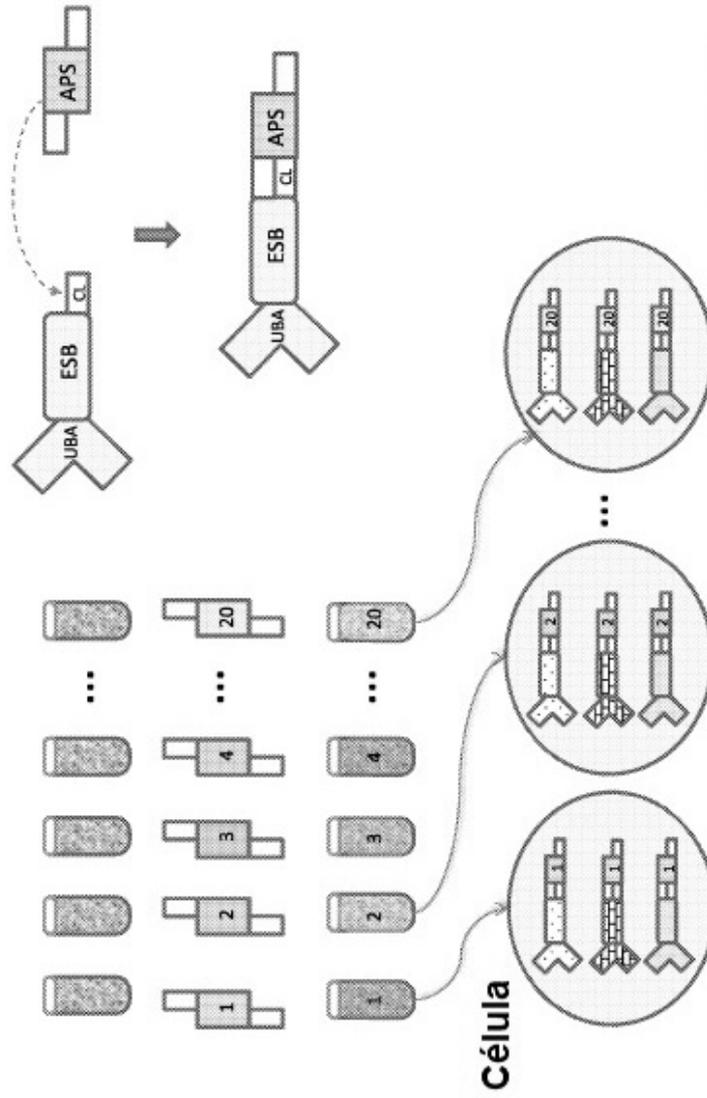
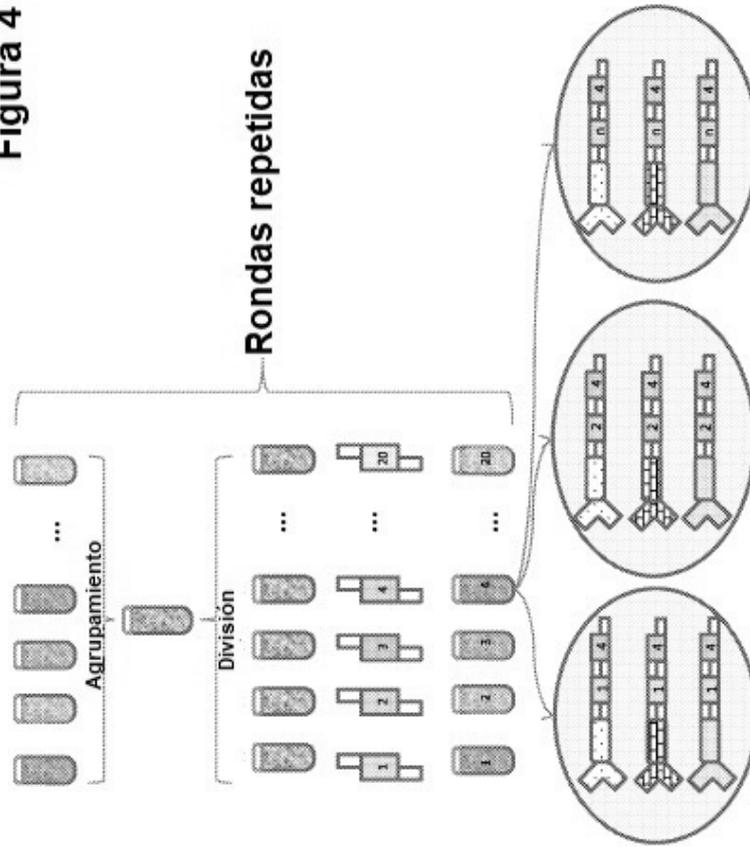


Figura 4

Figura 4 (cont.)



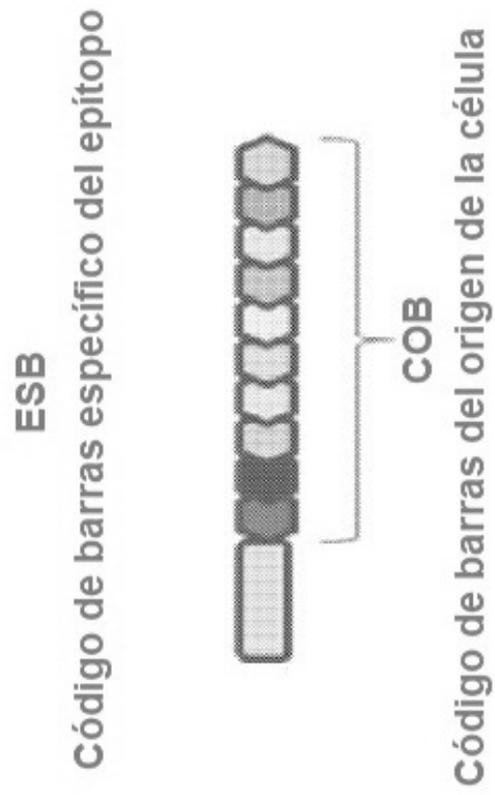
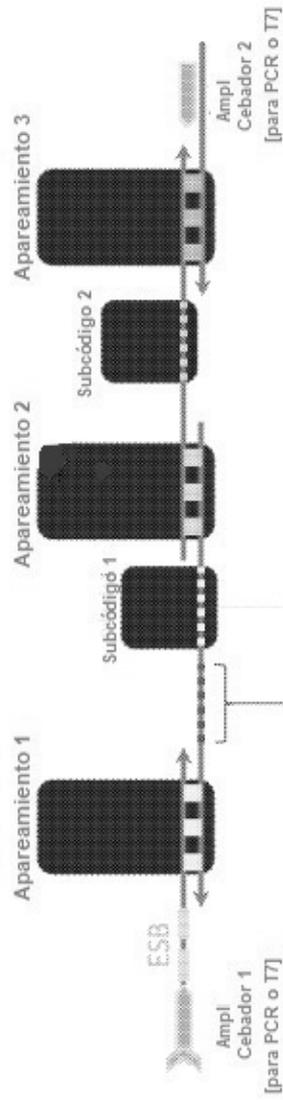


Figura 5



Subcódigo con verificación de bits de errores

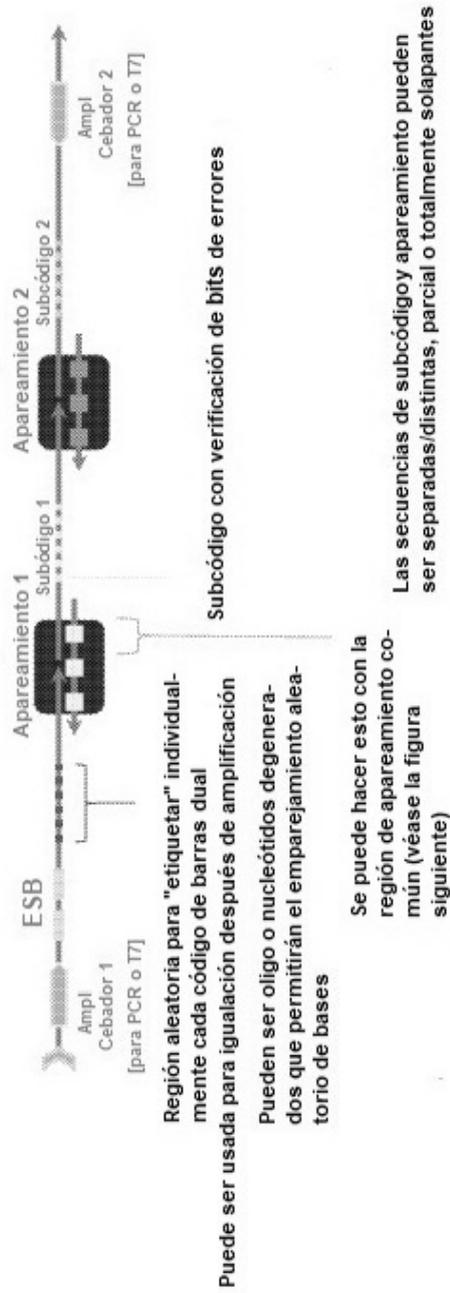
Región aleatoria para "etiquetar" individualmente cada código de barras dual. Se puede usar igualación después de amplificación.

Las secuencias de subcódigo y apareamiento pueden ser separadas/distintas, parcialmente solapantes

Pueden ser oligo o nucleótidos degenerados que permitirán el emparejamiento aleatorio de bases

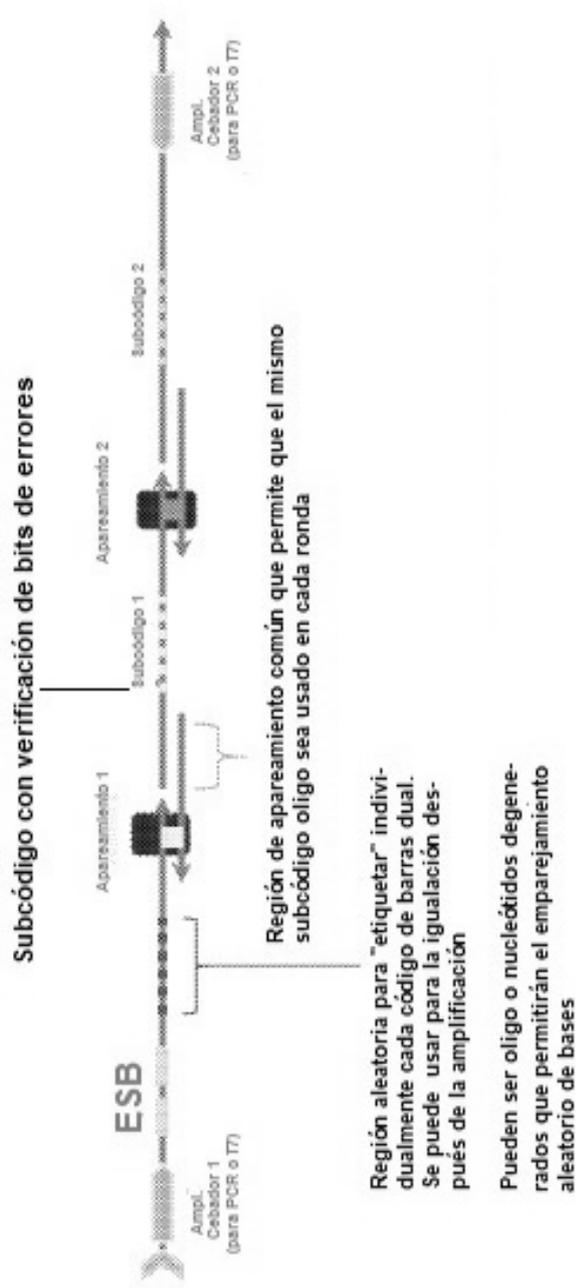
Figura 6

COB en mosaico



Unión COB_SPA (apareamiento con cebador específico)

Figura 7

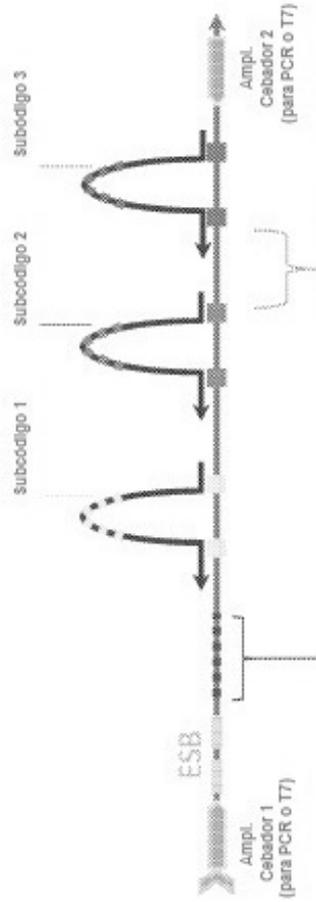


Las secuencias de subcódigo y apareamiento, pueden ser separadas/distintas, parcial o totalmente solapantes

Unión COB_CPA (apareamiento con el cebador común)

Figura 8

Subcódigo con verificación de bits de errores



Región aleatoria para "etiquetar" individualmente cada código de barras dual

Se puede usar para igualación después de amplificación

Pueden ser oligo o nucleótidos degenerados que permitirán el emparejamiento aleatorio de bases

Llenado con polimerasa y ligación, o si están adosados, ligación por química *clic*

Las secuencias de subcódigo y apareamiento pueden ser separadas/distintas, parcial o totalmente solapantes

COB en bucle

Figura 9

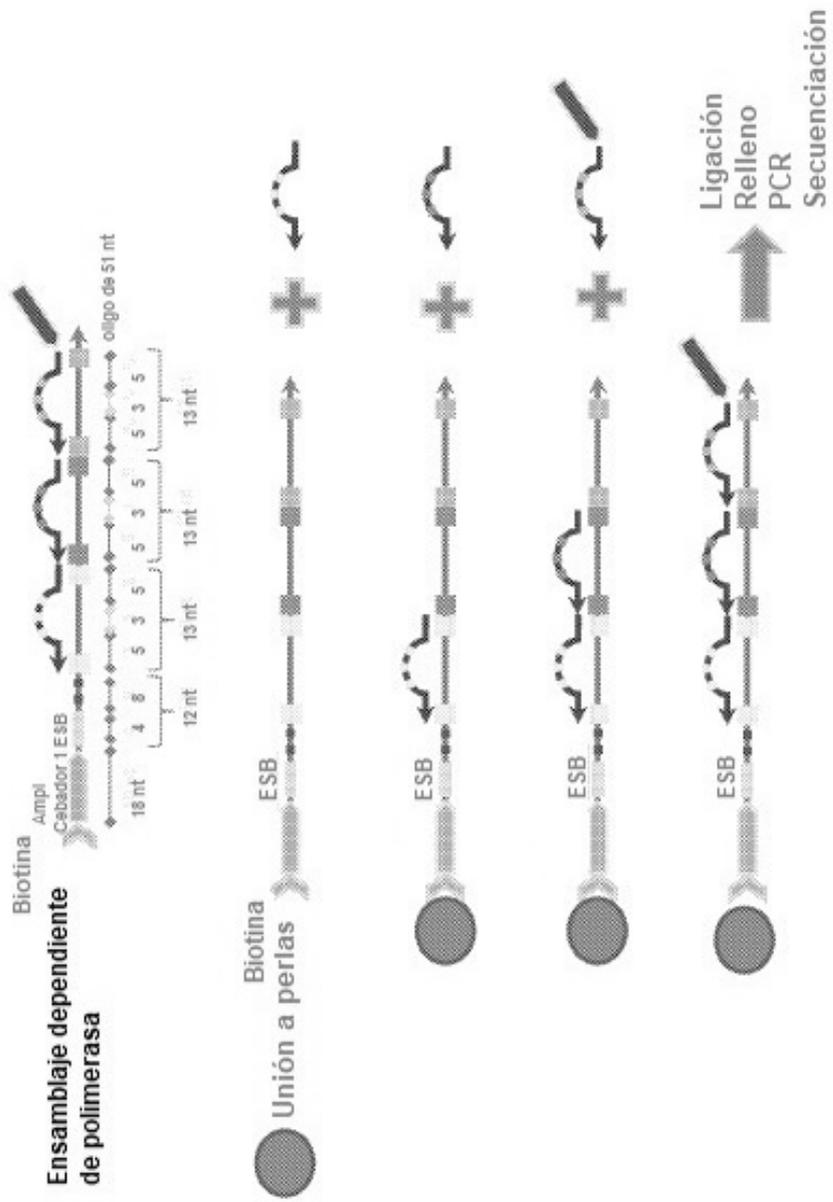


Figura 10

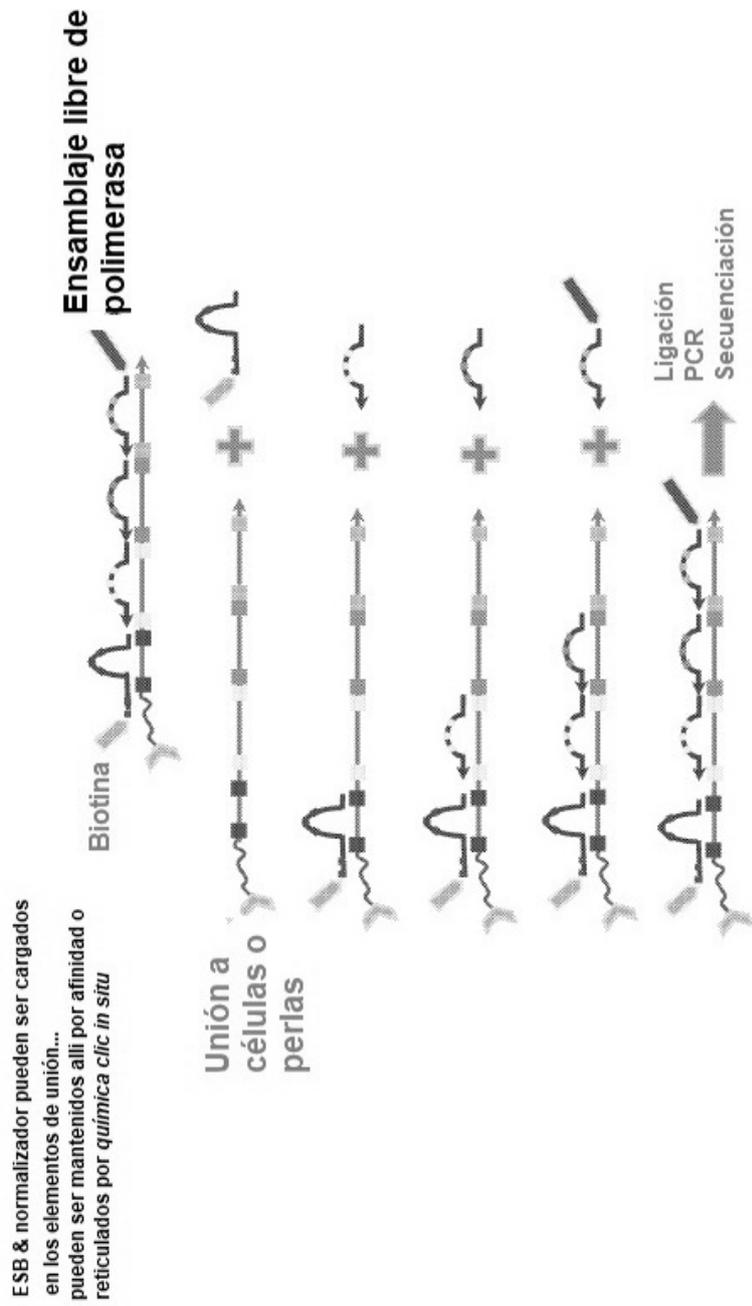


Figura 10 (cont.)

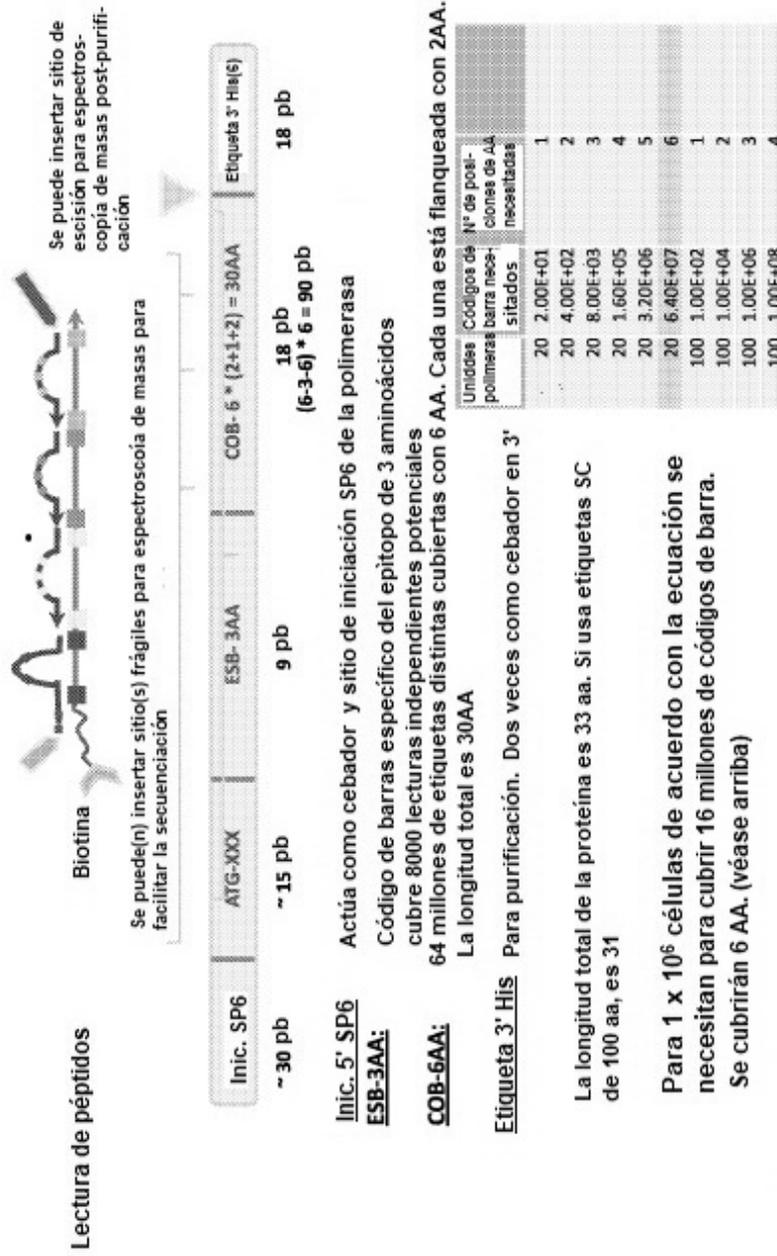


Figura 11