

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 502**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6841 (2008.01)

C12Q 1/6881 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2011 PCT/US2011/023126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11094669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2011 E 11702567 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2529030**

54 Título: **Métodos de detección in situ de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

29.01.2010 US 336944 P

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

10.07.2019

73 Titular/es:

**ADVANCED CELL DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
7707 Gateway Blvd.
Newark, CA 94560, US**

72 Inventor/es:

**LUO, YULING;
FLANAGAN, JOHN, JAMES;
CHEN, SHIPING y
WANG, HUEI-YU, FAY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 502 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de detección in situ de ácidos nucleicos

Declaración respecto a los derechos de las invenciones realizadas con investigación y desarrollo patrocinado por el gobierno federal

- 5 La presente invención se realizó con respaldo gubernamental conforme a la concesión n.º R43CA122444- 01 del National Cancer Institute Small Business Innovation Research Program y la concesión n.º W81XWH-06-1-0682 del United States Army Medical Research Acquisition Activity Breast Cancer Research Program. El gobierno puede tener determinados derechos con respecto a la presente invención.

Campo de la invención

- 10 En general, la invención se refiere a ensayos bioquímicos y química de ácidos nucleicos. Más particularmente, la invención se refiere a métodos para la detección in situ de analitos de ácidos nucleico en células individuales. La invención también se refiere a la detección e identificación de células individuales, particularmente células raras.

Antecedentes de la invención

- 15 Pruebas suficientes han demostrado que las células cancerosas pueden disociarse del tumor primario y circular en los ganglios linfáticos, la médula ósea, la sangre periférica u otros fluidos corporales. Estas células tumorales en circulación (CTC, por sus siglas en inglés) han demostrado que reflejan las características biológicas de los tumores primarios, incluida la posibilidad de desarrollo de metástasis y reaparición tumoral. Por lo tanto, la detección de las CTC puede indicar la reaparición de la enfermedad, diseminación de las células tumorales y potencial elevado de metástasis distantes. Todos estos son factores clínicos informativos significativos para identificar el estado de enfermedad de pacientes con cáncer de riesgo elevado (por ejemplo, Vogel et ál., 2002; Gilbey et ál., 2004; Molnar et ál., 2003; Vlems et ál., 2003; Ma et ál., 2003).

- 20 La validación de la utilidad clínica de la detección de CTC como indicador de pronóstico no ha evolucionado tan rápido como se esperaba, en gran parte debido a la falta de tecnologías de detección adecuadas. Una dificultad fundamental para la detección de CTC en sangre periférica u otros fluidos corporales es que las CTC están presentes en la circulación en concentraciones extremadamente bajas, que se calcula que se encuentran en el intervalo de una célula tumoral cada 106-107 glóbulos blancos normales. Como resultado, cualquier tecnología de detección para la presente solicitud debe mostrar sensibilidad y especificidad excepcionales para limitar tanto el índice de falsos negativos como el índice de falsos positivos hasta un nivel aceptable.

- 25 Un enfoque existente incorpora tecnología de separación inmunomagnética en la detección de CTC intactas (US 6,365,362; US 6,645,731). Utilizando esta tecnología, se incubaba una muestra de sangre de un paciente con cáncer con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos dirigidos contra un antígeno de superficie epitelial como, por ejemplo, EpCAM (Cristofanilli et ál., 2004). Las células etiquetadas de forma magnética luego se aíslan usando un separador magnético. La fracción enriquecida de forma inmunomagnética se procesa adicionalmente para el análisis posterior para la identificación de CTC. Usando esta tecnología, se demostró en un estudio prospectivo que la cantidad de CTC después del tratamiento es un predictor independiente de la supervivencia sin evolución y la supervivencia general en pacientes con cáncer de mama metastásico (Cristofanilli et ál., 2004). Si bien esta tecnología ha indicado alta sensibilidad, su capacidad de aplicación se ve limitada por la disponibilidad de detección de anticuerpos que son muy sensibles y específicos de tipos particulares de CTC. Los anticuerpos pueden demostrar unión no específica a otros componentes celulares, lo que puede conllevar una relación de señal a ruido baja e impedir la posterior detección. Los anticuerpos que se unen a CTC también pueden unirse al antígeno presente en otros tipos de células a nivel bajo, lo que genera un nivel elevado de falsos positivos.

- 30 Otro enfoque para determinar la presencia de CTC ha sido analizar la expresión específica de células tumorales de ARN mensajero en la sangre. Se ha usado reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (QPCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real para establecer una correlación entre la detección de CTC y el pronóstico del paciente. Se ha usado RT-PCR en tiempo real para la detección de ARNm CEA en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal (Ito et ál., 2002). La supervivencia sin evolución de los pacientes con ARNm CEA positivo en sangre posoperativa fue significativamente menor que en los casos que fueron negativos para ARNm CEA. Estos resultados sugieren que las células tumorales se diseminaron en el torrente sanguíneo y generaron malos resultados en los pacientes con cáncer colorrectal. Otro informe demostró la utilidad clínica de la detección molecular de CTC en pacientes con melanoma en estadio IIBC y IIIAB del AJCC con riesgo elevado usando múltiples marcadores de ARNm mediante QPCR (Mocellin et ál., 2004). La ventaja de detección de la expresión de ARNm específica del tumor es que se puede usar cualquier gen específico del tumor que sea útil como marcador de diagnóstico/pronóstico. Sin embargo, el enfoque de QPCR requiere el difícil procedimiento de aislamiento del ARNm de la muestra de sangre y la transcripción inversa antes de la reacción de PCR. A menudo se observan falsos positivos mediante el uso de esta técnica debido a la contaminación de la muestra mediante ADN cromosómico o expresión de nivel bajo del gen marcador seleccionado en células sanguíneas normales (Fava et ál. 2001). Además, la sensibilidad del límite de detección de esta técnica es, como mucho, de aproximadamente una célula tumoral cada 1 ml de sangre, y la tecnología no puede proporcionar un recuento preciso de la cantidad de CTC.

El documento WO 2007/001986 describe métodos de detección de múltiples dianas de ácidos nucleicos en células individuales y métodos de identificación de células raras de poblaciones celulares heterogéneas grandes.

5 El documento US 2008/0008994 describe sondas y métodos de ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en inglés) para el análisis de determinadas especies Staphylococcus en una muestra, en métodos particulares de diferenciación entre la especie Staphylococcus en lugar de S. aureus.

Las técnicas rápidas y sensibles para la detección de CTC, y más generalmente para la detección de ácidos nucleicos en células son, por lo tanto, deseables. La presente invención satisface estas y otras necesidades, entre otras, proporcionar métodos para la detección de ácidos nucleicos en y para la identificación de células individuales. Se obtendrá una comprensión completa de la invención tras la revisión de lo siguiente.

10 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un método de detección de una célula individual de un tipo determinado en una muestra que comprende una mezcla de tipos celulares, que comprende al menos una célula del tipo determinado, en donde la célula comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico, en donde las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos siempre coexisten en la célula, en donde el método comprende:

15 (a) proporcionar una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y proporcionar una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una primera señal de la primera etiqueta no se puede distinguir de una segunda señal de la segunda etiqueta;

20 (b) captar, en la célula, la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, y la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, en donde las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos son moléculas individuales, en donde captar comprende:

proporcionarle a la primera diana de ácido nucleico al menos una primera sonda de captura y proporcionarle a la segunda diana de ácido nucleico al menos una segunda sonda de captura;

25 captar la primera sonda de captura de la primera diana de ácido nucleico, que comprende hibridar en la célula la primera sonda de captura con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con la primera sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta con la primera diana de ácido nucleico; y

30 captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico, que comprende hibridar en la célula la segunda sonda de captura con el segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con la segunda sonda de captura, captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico;

(c) detectar la señal de las etiquetas;

(d) establecer una correlación entre la señal detectada a partir de la célula y la presencia o cantidad de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos en la célula; y

35 (e) identificar la célula como del tipo determinado en función de la detección de la presencia o cantidad de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos dentro de la célula, en donde el tipo determinado de célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla según la presencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico y la presencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula dos o más primeras sondas de captura distintas con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con dos o más primeras sondas de captura distintas, captando así la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula dos o más segundas sondas de captura distintas del segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con dos o más segundas sondas de captura distintas, captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador, en donde el amplificador es una molécula capaz de hibridarse con múltiples sondas de etiqueta; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana de dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas de captura distintas con el amplificador, e

5 hibridar el amplificador con la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador y un preamplificador; en donde captar la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana de dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas de captura distintas con el amplificador, hibridar el amplificador con el preamplificador, e hibridar el amplificador con la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el preamplificador, hibridar el preamplificador con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador se realiza a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dos o más sondas de captura distintas se hibridan con secciones únicas y adyacentes en la diana de ácido nucleico.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con sus dianas de ácidos nucleicos correspondientes se realiza a una temperatura de hibridación inferior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico, o donde la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con sus dianas de ácidos nucleicos correspondientes se realiza a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además proporcionar múltiples dianas de ácidos nucleicos adicionales; en donde el método comprende además: proporcionar múltiples sondas de etiqueta, cada una de las cuales comprende una etiqueta, en donde la señal de cada etiqueta se puede distinguir de las primeras y segundas señales o entre sí; proporcionar al menos una sonda de captura para cada una de las dianas de ácidos nucleicos adicionales, hibridar en la célula cada sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula, e hibridar cada sonda de etiqueta con su sonda de captura correspondiente, y detectar la señal a partir de las etiquetas.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la primera diana de ácido nucleico y la segunda diana de ácido nucleico se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un ADN, un ARN, un ADN cromosómico, un ARNm, un ácido nucleico endógeno de la célula, un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno y un ARN citoplásmico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención,

- (i) la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y donde la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm; o
- 45 (ii) la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y donde la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico; o
- (iii) la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda diana de ácido nucleico comprende una molécula de ADN de cadena doble, el método comprende desnaturalizar el ADN de cadena doble antes de la hibridación de las primeras y segundas sondas de captura con las primeras y segundas dianas de ácido nucleico.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención,

- (i) aproximadamente 1000 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 1000 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o
- 55 (ii) aproximadamente 100 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 100 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o

(iii) aproximadamente 10 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 10 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o

(iv) aproximadamente 5 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 5 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o

5 (v) una única copia de la primera diana de ácido nucleico y/o una única copia de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la primera diana de ácido nucleico, la segunda diana de ácido nucleico y/o la diana de ácido nucleico adicional se seleccionan del grupo que consiste en: CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Mucl, EGFR, Twist, N- Cadherina y Fibronectina.

10 Además, la presente invención proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de múltiples dianas de ácido nucleico en una célula individual en una muestra que comprende la célula, que comprende o se sospecha que comprende dichas múltiples dianas de ácido nucleico, en donde dichas dianas de ácido nucleico siempre coexisten en la célula, en donde el método comprende:

15 (a) proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, una sonda de etiqueta que comprende una etiqueta, en donde una señal de la etiqueta de una primera diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico no se puede distinguir de una señal de la etiqueta de una segunda diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico, en donde las primeras y segundas dianas de ácido nucleico son moléculas individuales;

(b) proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, al menos una sonda de captura;

20 (c) hibridar en la célula, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula;

(d) captar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de etiqueta de la sonda de captura, captando así la sonda de etiqueta en su diana de ácido nucleico correspondiente; y

25 (e) detectar la señal de la etiqueta de las sondas de etiqueta captadas en las múltiples dianas de ácido nucleico,

en donde la presencia de señal indica la presencia de un miembro de las múltiples dianas de ácido nucleico y la ausencia de señal indica la ausencia de las dianas de ácido nucleico en la célula.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las múltiples dianas de ácido nucleico comprenden genes constitutivos de distintos tejidos en una especie particular, en donde la especie es preferiblemente un humano.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención,

(i) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde cada una de dos o más sondas de captura comprende una sección T que es complementaria a una región de su diana de ácido nucleico correspondiente y una sección L que es complementaria a una región de su sonda de etiqueta correspondiente; además, las secciones T de dos o más sondas de captura son complementarias a regiones no superpuestas de la diana de ácido nucleico y las secciones L de dos o más sondas de captura son complementarias a regiones no superpuestas de la sonda de etiqueta, y donde el método comprende hibridar una sonda de etiqueta con dos o más sondas de captura;

40 (ii) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador; y donde el método comprende hibridar una sonda de etiqueta con un amplificador e hibridar el amplificador con dichas dos o más sondas de captura; o

(iii) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador y un preamplificador; y donde el método comprende hibridar el preamplificador con dos o más sondas de captura, hibridar el amplificador con el preamplificador e hibridar una sonda de etiqueta con el amplificador.

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende la etapa de hibridar cada conjunto de dos o más sondas de captura con el ácido nucleico diana correspondiente a una temperatura de hibridación (a) superior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto, o (b) superior a la temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende la etapa de hibridar cada conjunto de dos o más sondas de captura con el ácido nucleico diana correspondiente a una temperatura de hibridación (a) superior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto e inferior a la temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto, o (b) superior a la

temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto e inferior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las múltiples dianas de ácido nucleico se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un ADN, un ARN, un ADN cromosómico, un ARNm, un ácido nucleico endógeno de la célula, un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno y ARN citoplásmicos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 5' de las secciones L, o donde dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 3' de las secciones L.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, cada etapa de hibridación o captura se logra para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula es una célula tumoral en circulación.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula se encuentra en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o donde la célula se encuentra en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la muestra que comprende la célula deriva de un fluido corporal, sangre o una sección de tejido.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar una muestra comprende fijar y permeabilizar la célula.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende lavar la célula para retirar los materiales no captados por una de las dianas de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la detección de la señal comprende realizar citometría de flujo.

25 En esta solicitud, se describen métodos de detección de la presencia o ausencia de una clase de dianas de ácidos nucleicos en células individuales mediante captura directa o indirecta de etiquetas en los ácidos nucleicos, en donde dichas etiquetas de la clase de dianas de ácidos nucleicos no se pueden distinguir entre sí. También se describen métodos de detección de células individuales, particularmente una célula de un tipo específico de poblaciones celulares heterogéneas grandes, mediante la detección de una o más dianas de ácido nucleico, en donde las etiquetas de una o más dianas de ácido nucleico no pueden distinguirse entre sí. También se describen kits relacionados.

30

En la presente se describen métodos de detección de una célula individual de un tipo determinado, el método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que comprende una mezcla de tipos celulares, la cual comprende al menos una célula del tipo determinado; proporcionar una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y proporcionar una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una primera señal de la primera etiqueta no puede distinguirse de una segunda señal de la segunda etiqueta; captar, en la célula, la primera sonda de etiqueta en una primera diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, y la segunda sonda de etiqueta en una segunda diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula; detectar la señal de las etiquetas; establecer una correlación entre la señal detectada de la célula y la presencia, ausencia o cantidad de primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos en la célula; e identificar la célula como del tipo determinado en función de la detección de la presencia, ausencia o cantidad de primeras o segundas dianas de ácidos nucleicos dentro de la célula, en donde el tipo determinado de célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla en función de la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico o la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

35

40

En una realización, el método proporciona al menos una primera sonda de captura y una segunda sonda de captura, en donde cada una de las sondas de captura comprende una sección T que es complementaria de una región del ácido nucleico diana y una sección L que es complementaria de la sonda de etiqueta; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula la primera sonda de captura con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con la primera sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula la segunda sonda de captura del segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con la segunda sonda de captura, captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico.

45

50

En una realización preferida, el método proporciona al menos una primera sonda de captura que comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un

55

conjunto; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula dos o más primeras sondas de captura distintas con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con dos o más primeras sondas de captura distintas, captando así la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula dos o más segundas sondas de captura distintas del segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con dos o más segundas sondas de captura distintas, captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico.

En otro aspecto, las sondas de etiqueta se captan en las sondas de captura de manera indirecta, por ejemplo, a través de la unión de preamplificadores y/o amplificadores. En una clase de realizaciones en la cual se emplean amplificadores, el método comprende además un amplificador, en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana de dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas de captura distintas con el amplificador, e hibridar el amplificador con la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico.

En una clase de realizaciones en la cual se emplean preamplificadores, el método proporciona además un amplificador y un preamplificador, en donde captar la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana con dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas de captura distintas con el preamplificador, hibridar el preamplificador con el amplificador, e hibridar el amplificador con la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el preamplificador, hibridar el preamplificador con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico.

En un aspecto, la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador se puede realizar a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador.

Además, dos o más sondas de captura distintas se pueden hibridar con secciones únicas y adyacentes en la diana de ácido nucleico.

En otro aspecto, la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con su diana de ácido nucleico correspondiente se puede realizar a una temperatura de hibridación inferior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico.

En otro aspecto, la hibridación de dos o más sondas de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente se puede realizar a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico.

En un aspecto, dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 5' de las secciones L, o donde dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 3' de las secciones L.

En otra realización, el método además puede proporcionar múltiples dianas de ácidos nucleicos adicionales; en donde el método comprende: proporcionar múltiples sondas de etiqueta, cada una de las cuales comprende una etiqueta, en donde la señal de cada etiqueta no se puede distinguir de las primeras y segundas señales o entre sí; proporcionar al menos una sonda de captura para cada una de las dianas de ácidos nucleicos adicionales, hibridar en la célula cada sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula, e hibridar cada sonda de etiqueta con su sonda de captura correspondiente, y detectar la señal a partir de las etiquetas.

En un aspecto, cada etapa de hibridación o captura del método se puede lograr para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo.

En un aspecto del método, la primera diana de ácido nucleico y la segunda diana de ácido nucleico se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un ADN, un ARN, un ADN cromosómico, un ARNm, un ácido nucleico endógeno de la célula, y un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno. En una realización, la primera diana de ácido nucleico puede ser un primer ARNm y la segunda diana de ácido nucleico puede ser un segundo ARNm. En otra realización, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico. La primera diana de ácido nucleico puede comprender una primera región de un ARNm y donde la segunda diana de ácido nucleico puede comprender una segunda región del mismo ARNm. En otra realización, la primera diana de ácido nucleico y/o la

segunda diana de ácido nucleico es un ARN citoplásmico.

En un aspecto del método, la célula que se debe detectar es una célula tumoral en circulación.

En otro aspecto del método, la muestra que comprende la célula deriva de un fluido corporal, sangre o una sección de tejido. En una realización, el método de identificación de la célula como una célula diana deseada se puede basar en la detección de las señales desde el interior de la célula.

En un aspecto del método, proporcionar una muestra comprende fijar y permeabilizar la célula. En otro aspecto del método, el método comprende lavar la célula para retirar los materiales no captados por una de las dianas de ácido nucleico.

En un aspecto del método, la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda diana de ácido nucleico comprende una molécula de ADN de cadena doble, el método comprende desnaturalizar el ADN de cadena doble antes de la hibridación de las primeras y segundas sondas de captura con las primeras y segundas dianas de ácido nucleico. En otro aspecto del método, la célula se encuentra en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o donde la célula se encuentra en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. En aun otro aspecto del método, la detección de las primeras y segundas señales comprende realizar citometría de flujo.

Los métodos permiten la detección de incluso dianas de cantidad baja o de una sola copia. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, aproximadamente 1000 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 1000 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula (por ejemplo, aproximadamente 100 copias o menos, aproximadamente 50 copias o menos, aproximadamente 10 copias o menos, aproximadamente 5 copias o menos, o incluso una única copia).

En una realización del método, la primera diana de ácido nucleico, la segunda diana de ácido nucleico y/o la diana de ácido nucleico adicional se seleccionan del grupo que consiste en: CK8, CK14, C17, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Mucl, EGFR, Twist, N-Cadherina y Fibronectina.

Además, se describe en la presente un kit para la detección de una célula individual de un tipo determinado a partir de una mezcla de tipos celulares. El kit comprende: al menos una primera sonda de captura capaz de hibridarse con la primera diana de ácido nucleico; al menos una segunda sonda de captura capaz de hibridarse con la segunda diana de ácido nucleico; una primera sonda de etiqueta que comprende una primera sonda de etiqueta y una segunda sonda de etiqueta, en donde la primera sonda de etiqueta es capaz de hibridarse con la primera sonda de captura y la segunda sonda de etiqueta es capaz de hibridarse con la segunda sonda de captura; en donde una primera señal de la primera etiqueta no puede distinguirse de una segunda señal de la segunda etiqueta; en donde el tipo determinado de célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla mediante la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda diana de ácido nucleico; y se envasa en uno o más recipientes.

Básicamente todas las características mencionadas para las realizaciones de método de detección anteriores también se aplican a estos kits, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto a la cantidad de dianas de ácido nucleico, inclusión de sondas de captura, configuración y cantidad de las sondas de etiqueta y/o captura, etiquetas no distinguibles, inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, inclusión de reactivos de amplificación, tipo de diana de ácido nucleico, ubicación de varias dianas en una única molécula o en distintas moléculas, tipo de etiquetas, varios esquemas de temperatura de hibridación, sondas de captura que tienen la sección T 5 ' de las secciones L o tienen la sección T 3 ' de las secciones L, métodos de procesamiento de muestras, cantidad de copias de la diana, y/o similares.

En la presente se describen métodos de detección de la presencia o ausencia de una clase de dianas de ácido nucleico en una célula individual, en donde la clase de dianas de ácido nucleico consiste en múltiples dianas de ácido nucleico. El método comprende: proporcionar una muestra que comprende la célula, la cual comprende o se sospecha que comprende dicha clase de dianas de ácido nucleico; proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, una sonda de etiqueta que comprende una etiqueta, en donde una señal de la etiqueta de una diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico puede distinguirse de una señal de la etiqueta de otra diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico; proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, al menos una sonda de captura; hibridar en la célula, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula; captar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de etiqueta en la sonda de captura, captando así la sonda de etiqueta en su diana de ácido nucleico correspondiente; y detectar la señal de la etiqueta de las sondas de etiqueta captadas en las múltiples dianas de ácido nucleico.

La clase de dianas de ácido nucleico puede consistir en papilomavirus humano (HPV, por sus siglas en inglés) de alto riesgo. De manera específica, el HPV de alto riesgo puede comprender subtipos de HPV de: HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82.

En otra realización, las múltiples dianas de ácido nucleico comprenden genes constitutivos de distintos tejidos en una especie particular. En una realización específica, la especie es un humano.

Básicamente todas las características mencionadas para las realizaciones anteriores relacionadas con el método de detección de una célula individual de un tipo específico se aplican a estas realizaciones de un método de detección de una clase de dianas de ácido nucleico también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto a la inclusión de sondas de captura, configuración y cantidad de las sondas de etiqueta y/o captura, etiquetas no distinguibles, inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, inclusión de reactivos de amplificación, tipo de diana de ácido nucleico, ubicación de varias dianas en una única molécula o en distintas moléculas, tipo de etiquetas, varios esquemas de temperatura de hibridación, sondas de captura que tienen la sección T 5 ' de las secciones L o tienen la sección T 3 ' de las secciones L, métodos de procesamiento de muestras, y/o similares.

Breve descripción de los dibujos

10 La presentación de esta patente contiene al menos un dibujo a color. Si se solicitara, y una vez efectuado el pago de la tasa necesaria, la Oficina de marcas y patentes proporcionará copias de la presente patente con el o los dibujos a color.

La Figura 1 ilustra de manera esquemática el flujo de trabajo de la tecnología QMAGEX para un ejemplo de realización.

15 La Figura 2 ilustra de manera esquemática un enfoque de etiquetado directo en el que las sondas de etiqueta se hibridan con el ácido nucleico diana.

La Figura 3 ilustra de manera esquemática un enfoque de etiquetado indirecto en el que las sondas de etiqueta se hibridan con las sondas de captura hibridadas con el ácido nucleico diana.

20 La Figura 4 ilustra de manera esquemática un enfoque de diseño de la sonda de captura de etiquetado indirecto que utiliza un par de sondas de captura independientes para potenciar la especificidad de la captura de la sonda de etiqueta con el ácido nucleico diana.

La Figura 5 ilustra de manera esquemática un enfoque de diseño de la sonda de captura de etiquetado indirecto que utiliza tres o más sondas de captura independientes para potenciar la especificidad de la captura de la sonda de etiqueta con el ácido nucleico diana.

25 La Figura 6 ilustra de manera esquemática los enfoques de diseño de sonda para detectar múltiples moléculas diana en paralelo usando etiquetado directo (Panel A) o etiquetado indirecto con dos sondas de captura independientes (Panel B).

30 La Figura 7 ilustra de manera esquemática los enfoques de diseño de sonda para reducir los índices de falsos positivos en la identificación de células raras mediante la unión de múltiples tipos de partículas que generan señales (etiquetas) a la misma molécula diana. El Panel A muestra múltiples tipos de partículas que generan señales (etiquetas) en una diana. El Panel B muestra múltiples tipos de partículas que generan señales (etiquetas) en más de una diana, en donde las potencias de señales relativas del conjunto de partículas se mantienen en todas las dianas. El Panel C muestra un conjunto de partículas que generan señales (etiquetas) en una molécula diana, en donde distintas dianas tienen conjuntos característicamente distintos.

35 La Figura 8 ilustra de manera esquemática un ensayo multiplex de dos ácidos nucleicos en células en suspensión.

Los Paneles A-D de la Figura 9 ilustran de manera esquemática distintas estructuras de ejemplos de amplificadores.

40 La Figura 10 ilustra de manera esquemática el uso de amplificación por círculo rodante para amplificar la señal. Como se muestra en el Panel A, se une una molécula de nucleótido circular con la(s) sonda(s) de captura. Como se muestra en el Panel B, una molécula de cadena larga con muchas secuencias repetidas parece ser un resultado de la amplificación por círculo rodante. Como se muestra en el Panel C, muchas sondas de señales se pueden hibridar con las secuencias repetidas para lograr la amplificación de señales.

La Figura 11 ilustra de manera esquemática una realización de la configuración del instrumento del ensayo.

45 Los Paneles A-E de la Figura 12 ilustran la detección de 18S ARN en células HeLa usando el sistema 16XAMP2 (Panel A) versus los controles usando el sistema 1XAMP3 (Panel B), las sondas de captura complementarias a la cadena antisentido (Panel C), y la mitad del conjunto de sondas de captura (Paneles D y E).

Los Paneles A-D de la Figura 13 ilustran la detección multiplexada de 18S ARN y Her-2 ARNm en células HeLa (Paneles A y C) y células SKBR3 (Paneles B y D). Los Paneles C-D representan un experimento de control, en el cual se usaron sondas de captura que se dirigen a la cadena antisentido de la secuencia de intrones Her-2.

La Figura 14 presenta una gráfica que compara la detección de Alexa488 y Fast Red.

50 Los Paneles A-D de la Figura 15 ilustran la detección de cambios en la expresión de IL-6 e IL-8 en células individuales. En los Paneles A-B se muestran células HeLa en reposo y en los Paneles C-D se muestran células tratadas con PMA. La expresión de IL-6 se muestra en los Paneles A y C y la expresión de IL-8 se muestra en los

Paneles B y D.

La Figura 16 ilustra la detección de células cancerosas en poblaciones celulares mixtas. El Panel A ilustra la detección de células SKBR3 mezcladas con células Jurkat. El Panel B ilustra la detección de células de cáncer de mama BT474 mezcladas con células sanguíneas.

- 5 La Figura 17 ilustra la detección en células HeLa suspendidas. El Panel A muestra células no hibridadas con sondas de captura o amplificadores de señales. El Panel B muestra células hibridadas con sondas de captura 18S y un sistema 1XAMP3. El Panel C muestra células hibridadas con sondas de captura 18S y un sistema 16XAMP2. El Panel D muestra un histograma de citometría de flujo correspondiente.

La Figura 18 presenta un histograma de citometría de flujo que ilustra la detección de ARNm en copias bajas.

- 10 Los Paneles A-I de la Figura 19 ilustran de manera esquemática distintas configuraciones de sondas de captura. La línea horizontal sólida representa el ácido nucleico diana, y la línea horizontal punteada representa una sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador.

- 15 La Figura 20 ilustra la detección específica de una variante de empalme. La unión de dos sondas de captura con la variante de empalme genera su detección (Panel A). No se detecta otra variante (Panel B), a la cual solamente se une una de las dos sondas de captura.

La Figura 21 ilustra la detección específica de una variante de empalme a través de la captura de dos etiquetas distintas en distintas regiones de la variante.

- 20 Los Paneles A-D de la Figura 22 ilustran la detección de MAGEX de ARNm en sección de tejido FFPE de cáncer de mama: 18S en el Panel A, β -actina en el Panel B, Ck19 en el Panel C, e intrón 18S de control en el Panel D. Las secciones que se muestran en los Paneles A-D también se tiñen con DAPI.

- 25 Los Paneles A-F de la Figura 23 ilustran la detección de ARNm en copias bajas en secciones de tejido FFPE de cáncer de mama. La detección de Her-2 se muestra en los Paneles A-C; el Panel A muestra la tinción con hematoxilina de Gill de núcleos celulares, el Panel B muestra la detección de ARNm Her-2 usando un ensayo MAGEX con una sonda configurada para el sustrato Her-2 y Fast Red, y el Panel C muestra una imagen fusionada para Her-2 y hematoxilina de Gill. En los Paneles D-F se muestra un control en el que no se empleó una sonda diana; el Panel D muestra la tinción con hematoxilina de Gill de núcleos celulares, el Panel E muestra la detección usando Fast Red (pero sin sonda diana) y el Panel F muestra una imagen fusionada para Her-2 y hematoxilina de Gill.

- 30 Los Paneles A-I de la Figura 24 ilustran la detección de un ARNm en micromatriz de tejido. Los Paneles A-C muestran la tinción con hematoxilina de Gill de núcleos celulares en las secciones de tejido. Los Paneles D-F muestran las secciones de tejido etiquetadas con un ensayo MAGEX usando sondas contra CK19 (Panel D), Her-2 (Panel F) o un control sin sonda (Panel E). Los Paneles G-I muestran imágenes fusionadas para CK19 y hematoxilina de Gill (Panel G), Her-2 y hematoxilina de Gill (Panel I) y control sin sonda y hematoxilina de Gill (Panel H).

- 35 Los Paneles A-D de la Figura 25 ilustran de manera esquemática la identificación de CTC en muestras de sangre de cuatro pacientes con cáncer de mama distintos. La tinción es Fast Red (para CK19) y DAPI.

- 40 Los Paneles A-B de la Figura 26 ilustran de manera esquemática distintas configuraciones de sondas de etiqueta adicionales in situ. El Panel A muestra una sonda de etiqueta grande que comprende múltiples partículas de etiquetas o moléculas captadas por una sonda de captura. El Panel B muestra una única sonda de etiqueta grande captada por cada una de dos o más sondas de captura.

Los Paneles A-B de la Figura 27 ilustran de manera esquemática distintas configuraciones de sondas de captura adicionales in situ. El Panel A muestra una sonda de captura que captura múltiples sondas de etiqueta, o amplificadores o preamplificadores. El Panel B muestra dos o más sondas de captura que capturan de forma conjunta múltiples etiquetas, o amplificadores o preamplificadores.

- 45 La Figura 28 muestra los datos de validación experimental de nueve marcadores de ARN (CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Muc1 y EGFR) seleccionados para identificar CTC de tipo epitelial.

La Figura 29 muestra los datos de validación experimental de tres marcadores de ARN (Twist, N-Cadherina y Fibronectina) seleccionados para identificar CTC EMT.

- 50 La Figura 30 muestra las señales comparativas de células tumorales añadidas usando grupos marcadores CK19, pan-CK y pan-CTC.

Las figuras esquemáticas no se encuentran necesariamente a escala.

Definiciones

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que les otorga comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Las siguientes definiciones complementan aquellas de la técnica, hacen referencia a la presente solicitud y no serán necesariamente vinculadas a cualquier caso relacionado o no relacionado, por ejemplo, a cualquier patente o solicitud de propiedad común. Si bien puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la práctica para evaluar la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Por consiguiente, la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no intenta ser limitante.
- Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «uno» y «el» incluyen referentes en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a «una molécula» incluye múltiples de dichas moléculas, y similares.
- El término «aproximadamente», como se usa en la presente, indica que el valor de una cantidad determinada varía en +/- 10 % del valor, u opcionalmente +/- 5 % del valor o, en algunas realizaciones, en +/- 1 % del valor descrito.
- El término «polinucleótido» (y la expresión equivalente «ácido nucleico») comprende cualquier cadena física de unidades monoméricas que pueda corresponderse con una cadena de nucleótidos, incluido un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un polímero de ADN o ARN típico), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no sean comunes del ARN o ADN biológicos, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados), y similares. Los nucleótidos del polinucleótido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de nucleótidos, pueden ser de origen natural o no natural, y pueden encontrarse sustituidos, modificados, no sustituidos o no modificados. Los nucleótidos pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster o mediante enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato, enlaces boranofosfato o similares. Además, el polinucleótido puede comprender elementos no nucleotídicos tales como marcadores, inactivadores, grupos de bloqueo o similares. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, de cadena simple o de cadena doble.
- Una «diana de ácido nucleico» o «ácido nucleico diana» se refiere a un ácido nucleico, u opcionalmente una región de este, que debe detectarse.
- Una «secuencia de polinucleótido» o «secuencia de nucleótido» es un polímero de nucleótidos (un oligonucleótido, un ADN, un ácido nucleico, etc.) o un conjunto de caracteres que representan un polímero de nucleótido, dependiendo del contexto. A partir de cualquier secuencia de polinucleótido especificada, se puede determinar el ácido nucleico dado o la secuencia de polinucleótido complementaria (por ejemplo, el ácido nucleico complementario).
- El término «gen» se utiliza ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Los genes incluyen comúnmente secuencias de codificación y/o las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de dichas secuencias de codificación. El término «gen» puede aplicar a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o ARNm codificado por esa secuencia genómica.
- Los genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresado que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas que incluyen promotores y potenciadores a los cuales se unen las proteínas reguladoras, tales como factores de transcripción, dan como resultado la transcripción de secuencias adyacentes o cercanas.
- Dos polinucleótidos se «hibridan» cuando se asocian para formar un dúplex estable, por ejemplo, en condiciones de ensayo pertinentes. Los ácidos nucleicos se hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como unión de hidrógeno, exclusión de solvente, apilamiento de bases y similares. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" (Elsevier, Nueva York), así como en Ausubel, infra.
- Un primer polinucleótido «capaz de hibridarse» con un segundo polinucleótido contiene una primera secuencia de polinucleótidos que es complementaria de una segunda secuencia de polinucleótidos en el segundo polinucleótido. Los primeros y segundos polinucleótidos pueden formar un dúplex estable, por ejemplo, en condiciones de ensayo pertinentes.
- La «T_m» (temperatura de fusión) de un dúplex de ácido nucleico en determinadas condiciones (por ejemplo, condiciones de ensayo pertinentes) es la temperatura a la que la mitad de los pares de bases en una población del dúplex se encuentran disociadas y la otra mitad, asociadas. La T_m de un dúplex particular se puede calcular y/o medir, por ejemplo, al obtener una curva de desnaturalización térmica para el dúplex (donde la T_m es la temperatura que corresponde al punto medio en la transición observada de la forma de cadena doble a cadena simple).
- El término «complementario» se refiere a un polinucleótido que forma un dúplex estable con su «complemento», por ejemplo, en condiciones de ensayo pertinentes. Comúnmente, dos secuencias de polinucleótidos que son complementarias entre sí presentan malapareamientos en menos de aproximadamente 20 % de las bases, en

menos de aproximadamente 10 % de las bases, preferiblemente en menos de aproximadamente 5 % de las bases y, más preferiblemente, no presentan malapareamientos.

Una «etiqueta» es un resto que facilita la detección de una molécula. Las etiquetas comunes en el contexto de la presente invención incluyen etiquetas fluorescentes, luminiscentes, de dispersión de luz, radioactivas y/o colorimétricas. Las etiquetas adecuadas incluyen enzimas y restos fluorescentes, así como radionúclidos, sustratos, cofactores, inhibidores, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, puntos cuánticos y similares. Las patentes que ilustran el uso de dichas etiquetas incluyen las patentes de EE.UU. n.º N° 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241. Muchas etiquetas se encuentran disponibles comercialmente y se pueden usar en el contexto de la invención.

La expresión «sonda de etiqueta» se refiere a una entidad que se une a una molécula diana, directa o indirectamente, y permite que se detecte la diana, por ejemplo, mediante un instrumento de lectura. Una sonda de etiqueta (o «LP») es comúnmente un polinucleótido de cadena simple que comprende una o más etiquetas que proporcionan directa o indirectamente una señal detectable. La etiqueta puede unirse covalentemente al polinucleótido, o el polinucleótido puede estar configurado para unirse a la etiqueta (por ejemplo, un polinucleótido biotinilado puede unirse a una etiqueta asociada a estreptavidina). La sonda de etiqueta, por ejemplo, puede hibridarse directamente con un ácido nucleico diana, o puede hibridarse con un ácido nucleico que, a su vez, se hibrida con el ácido nucleico diana o con uno o más ácidos nucleicos alternativos que se hibridan con el ácido nucleico. Por lo tanto, la sonda de etiqueta puede comprender una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico diana, o puede comprender al menos una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos en una sonda de captura, amplificador o similar.

Una «sonda de captura» es un polinucleótido que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana y captar una o más sondas de etiqueta de dicho ácido nucleico diana. La sonda de captura puede hibridarse directamente con una o más sondas de etiqueta, o puede hibridarse con uno o más ácidos nucleicos que, a su vez, se hibridan con la sonda de etiqueta; por ejemplo, la sonda de captura puede hibridarse con un amplificador o un preamplificador. Por lo tanto, la sonda de captura incluye una primera secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos del ácido nucleico diana y una segunda secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una secuencia de polinucleótidos de la sonda de etiqueta, amplificador, preamplificador o similar. La segunda secuencia de polinucleótidos también puede comprender múltiples secciones de secuencias idénticas o diferentes. La sonda de captura es preferiblemente de cadena simple.

Un «amplificador» es una molécula, comúnmente un polinucleótido, que es capaz de hibridarse con múltiples sondas de etiqueta. Comúnmente, el amplificador se hibrida con múltiples sondas de etiqueta idénticas. El amplificador también se hibrida al menos con una sonda de captura o ácido nucleico unido a una sonda de captura. Por ejemplo, el amplificador se puede hibridar al menos con una sonda de captura y con múltiples sondas de etiqueta, o con un preamplificador y múltiples sondas de etiqueta. El amplificador puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico lineal, bifurcado, dentado o ramificado. Como se observó para todos los polinucleótidos, el amplificador puede incluir nucleótidos modificados y/o enlaces internucleótidos no estándar, así como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos estándar y/o enlaces fosfodiéster. Se describen amplificadores adecuados, por ejemplo, en USPN 5,635,352, USPN 5,124,246, USPN 5,710,264 y USPN 5,849,481.

Un «preamplificador» es una molécula, comúnmente un polinucleótido, que sirve como intermedio entre una o más sondas de captura y amplificadores. Comúnmente, el preamplificador se hibrida simultáneamente con una o más sondas de captura y con múltiples amplificadores. Ejemplos de preamplificadores se describen, por ejemplo, en USPN 5,635,352 y USPN 5,681,697.

Un «patógeno» es un agente biológico, comúnmente un microorganismo, que provoca enfermedad a su hospedador.

Un «microorganismo» es un organismo de tamaño microscópico o submicroscópico. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a bacterias, hongos, levadura, protozoarios, algas microscópicas (por ejemplo, algas unicelulares), virus (que se incluyen comúnmente en esta categoría si bien son incapaces de crecer y reproducirse fuera de las células hospedadoras), agentes subvirales, viroides y micoplasma.

Se define o se caracteriza una variedad de términos adicionales en la presente.

Descripción detallada

La detección de analitos de ácidos nucleicos en muestras biológicas se puede categorizar ampliamente en dos tipos de métodos: Detección de «muestra entera» e «in situ». En el método de detección de muestra entera, se lisan las células en la muestra, que libera las moléculas contenidas en las células, que incluyen los analitos de ácido nucleico, hacia la solución de muestra. Luego, las cantidades de los analitos de ácido nucleico de toda la muestra biológica se miden en la solución. En el método de detección in situ, los analitos de ácido nucleico se fijan dentro de las células hospedadoras y sus cantidades se miden a nivel de células individuales. Los métodos de la presente invención se refieren a la detección in situ.

La detección in situ de analitos de ácido nucleico es muy deseable por dos motivos principales. En primer lugar, las muestras biológicas son generalmente heterogéneas, por ejemplo, contienen distintos tipos de células donde solamente una subpoblación de las células es pertinente para la enfermedad. De manera temprana al comienzo de la enfermedad, la fracción de las células en la muestra que se ven afectadas por la enfermedad puede ser muy pequeña. Dado que muchos analitos de ácido nucleico que sirven como marcadores de la enfermedad existen no solamente en las células de la enfermedad sino también en las células normales, si bien en niveles diferentes, en dichos casos un enfoque de detección de muestra entera puede distorsionar los resultados de la medición. Este problema es particularmente grave si la población de células de la enfermedad representa una pequeña fracción de las células en la muestra. El segundo motivo es que la detección in situ mantiene la morfología celular y/o la estructura tisular intactas. La fusión de la información proporcionada por los marcadores moleculares de la enfermedad y la morfología celular y/o estructura tisular puede brindar un valor de diagnóstico clínico o científico adicional.

La hibridación in situ fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés) es un método bien establecido de localización y detección de secuencias de ADN en preparaciones celulares o secciones de tejido morfológicamente conservadas (Pinkel et ál., 1986). Comúnmente, el ensayo FISH emplea sondas de ADN especialmente construidas, que se etiquetan directamente con tintes fluorescentes y, en conjunto, abarcan aproximadamente 100.000 nucleótidos por diana. Los métodos descritos en la presente también pueden adaptarse para detectar y localizar secuencias de ADN in situ, si bien pueden emplear amplificación de señales para agregar cientos de etiquetas fluorescentes por par de sondas que se hibrida con aproximadamente 50 bases de secuencias diana. Como resultado, la resolución de detección de pares de bases se encuentra en el orden de mil nucleótidos o menos, es decir, más de cien veces mejor que la de FISH tradicional. Además, las características exclusivas en el diseño de conjuntos de sondas pueden mejorar significativamente la especificidad de hibridación, lo que facilita la multiplexación y mejora las relaciones de señal a ruido. El uso de oligos sintéticos también brinda el beneficio de escalabilidad del producto y regularidad de la calidad.

Se han usado técnicas de hibridación in situ similares, que en general se refieren a una tecnología «ISH» para detectar el ARNm dentro de las células individuales (Hicks et ál., 2004). Existen cuatro tipos principales de sondas que se usan comúnmente en la realización de ISH: las sondas de oligonucleótidos (usualmente 20-40 bases de longitud), sondas de ADN de cadena simple (200-500 bases de longitud), sondas de ADN de cadena doble, o sondas de ARN (200-5000 bases de longitud). Las sondas de ARN son actualmente las sondas más ampliamente utilizadas para la hibridación in situ ya que tienen la ventaja de que los híbridos de ARN-ARN son muy termoestables y son resistentes a la digestión mediante ARNasas. Sin embargo, la sonda de ARN es un método de etiquetado directo que presenta varias dificultades. En primer lugar, las sondas etiquetadas individuales deben prepararse para la detección de cada ARNm de interés. En segundo lugar, es técnicamente difícil detectar la expresión de múltiples ARNm de interés in situ al mismo tiempo. Como resultado, recientemente solo se ha registrado la detección secuencial de múltiples ARNm usando distintos métodos de etiquetado diferentes (Schrock et ál., 1996; Kosman et ál., 2004). Además, con métodos de etiquetado directos, no hay una forma correcta de controlar la posible hibridación cruzada con secuencias no específicas en las células. En resumen, la sensibilidad de detección de ISH tradicional está limitada a 10-20 copias de ARNm por célula. De hecho, actualmente no hay productos de ISH comerciales disponibles que puedan detectar de manera fiable el ARNm por debajo de 50 copias por célula. Esta es una desventaja fundamental para el uso de ISH tradicional en el diagnóstico dado que más del 95 % de los genes humanos se expresan a un nivel por debajo de 50 copias por célula (Zhang et ál. 1997) y muchos de los genes humanos detectables que presentan expresión elevada son genes constitutivos que se expresan de manera constitutiva con menor interés de diagnóstico.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo tipo de método de hibridación in situ que emplea ADN ramificado (ADNr) para la detección de ARNm en células individuales (Player et ál., 2001). Este método usa una serie de sondas de oligonucleótidos que tienen una parte que se hibrida con el ARNm específico de interés y otra parte que se hibrida con el ADNr para la amplificación de señales y la detección. ISH de ADNr presenta las ventajas de que las sondas de oligonucleótidos no etiquetadas se usan para la detección de cada ARNm de interés y que los reactivos de detección y amplificación de señales son componentes genéricos en el ensayo. Sin embargo, el amplificador usado en ensayos de ADNr típicos tiene una estructura molecular compleja grande. La experiencia de los autores de la presente invención en ensayos in situ indica que dichas moléculas grandes tienden a la congregación en la célula, lo que aumenta el ruido de fondo y produce señales falsas positivas. Este problema es particularmente serio en muestras de sección de tejido. Además, la hibridación no específica de las sondas de oligonucleótidos en ISH de ADNr puede volverse un problema serio cuando se tienen que usar varias de estas sondas para la detección de un ARNm de baja abundancia. Algunas de las sondas se pueden hibridar con las secuencias no previstas, lo que produce amplificación de señales del fondo, reduciendo así la sensibilidad de detección. De manera similar, si bien el uso de ISH de ADNr para detectar o cuantificar múltiples ARNm es deseable, dicha hibridación no específica de las sondas de oligonucleótidos es un problema potencial.

Entre otros beneficios, los métodos de la presente invención superan las dificultades mencionadas anteriormente y proporcionan mecanismos únicos de reducción de ruido de fondo y para mejorar la sensibilidad y especificidad de detección. Como resultado, son capaces de detección fiable de dianas de ácido nucleico dentro de células individuales con una sensibilidad bien por debajo de 50 copias por célula en un amplio intervalo de tipos de muestras biológicas, que incluyen, por ejemplo, secciones de tejido FFPE. Además, los métodos de la presente invención son

particularmente útiles para la identificación de células raras en una muestra con poblaciones celulares mixtas. Ejemplos de aplicaciones importantes incluyen, pero no se limitan a la detección de células tumorales en circulación (CTC) en la sangre u otros fluidos corporales, detección de células tumorales en secciones de tejido sólido, detección de células madre cancerosas en secciones de tumores sólidos o en fluidos corporales tales como sangre, y la detección de células fetales en sangre materna.

En otros aspectos, la presente descripción proporciona ensayos multiplex que se pueden usar para la detección simultánea, y opcionalmente la cuantificación, de dos o más dianas de ácido nucleico en una única célula. Los métodos se pueden usar para la detección del nivel de uno o más ácidos nucleicos diana, por ejemplo, absoluto o relativo al de un ácido nucleico de referencia en una célula individual.

En general, en los ensayos, se capta una sonda de etiqueta en cada ácido nucleico diana. La sonda de etiqueta se puede captar en la diana a través de la unión directa de la sonda de etiqueta con la diana. Sin embargo, preferiblemente, la sonda de etiqueta se capta indirectamente a través de la unión con las sondas de captura, amplificadores y/o preamplificadores que se unen a la diana. El uso de los amplificadores y preamplificadores opcionales facilita la captura de múltiples copias de la sonda de etiqueta en la diana, lo que amplifica la señal de la diana sin la necesidad de amplificación enzimática de la propia diana. preferiblemente, las sondas de etiqueta, sondas de captura, amplificadores y preamplificadores utilizados en el método de la invención tienen una estructura simple y un tamaño de molécula relativamente pequeño. Por lo tanto, las moléculas no unidas pueden retirarse por lavado fácilmente, lo que reduce el fondo y la probabilidad de señal falsa positiva. En una realización preferida, las sondas de etiqueta, sondas de captura, amplificadores y preamplificadores son de cadena simple. La unión de las sondas de captura es opcionalmente cooperativa, lo que reduce la referencia provocada por hibridación cruzada no deseada de sondas de captura con los ácidos nucleicos no diana (un mayor problema en ensayos multiplex que en ensayos singleplex dado que se deben usar más sondas en ensayos multiplex, lo que aumenta la probabilidad de hibridación cruzada).

Un aspecto de la invención se refiere a la detección de células individuales, que incluye la detección de células raras de una mezcla heterogénea de células, por ejemplo, en suspensión, unidas a una superficie sólida o en muestras de tejido sólido. Las células individuales se detectan mediante la detección de ácidos nucleicos cuya presencia, ausencia, cantidad de copias o similar son características de la célula.

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

La presente invención proporciona un método de detección de una célula individual de un tipo determinado en una muestra que comprende una mezcla de tipos celulares, que comprende al menos una célula del tipo determinado, en donde la célula comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico, en donde las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos siempre coexisten en la célula, en donde el método comprende:

(a) proporcionar una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y proporcionar una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una primera señal de la primera etiqueta no se puede distinguir de una segunda señal de la segunda etiqueta;

(b) captar, en la célula, la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, y la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, en donde las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos son moléculas individuales, en donde captar comprende:

proporcionarle a la primera diana de ácido nucleico al menos una primera sonda de captura y proporcionarle a la segunda diana de ácido nucleico al menos una segunda sonda de captura;

captar la primera sonda de captura de la primera diana de ácido nucleico, que comprende hibridar en la célula la primera sonda de captura con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con la primera sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta con la primera diana de ácido nucleico; y

captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico, que comprende hibridar en la célula la segunda sonda de captura con el segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con la segunda sonda de captura, captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico;

(c) detectar la señal de las etiquetas;

(d) establecer una correlación entre la señal detectada a partir de la célula y la presencia o cantidad de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos en la célula; y

(e) identificar la célula como del tipo determinado en función de la detección de la presencia o cantidad de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos dentro de la célula, en donde el tipo determinado de célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla según la presencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico y la presencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende 5 hibridar en la célula dos o más primeras sondas de captura distintas con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con dos o más primeras sondas de captura distintas, captando así la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula dos o más segundas sondas de captura distintas del segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con dos o más segundas sondas de captura distintas, 10 captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador, en donde el amplificador 15 es una molécula capaz de hibridarse con múltiples sondas de etiqueta; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana de dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas de captura distintas con el amplificador, e hibridar el amplificador con la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico 20 comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador y un preamplificador; en donde captar la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana de dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas 30 de captura distintas con el preamplificador, hibridar el preamplificador con el amplificador, e hibridar el amplificador con la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el preamplificador, hibridar el preamplificador con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda 35 diana de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador se realiza a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dos o más sondas de captura distintas se hibridan con secciones únicas y adyacentes en la diana de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con sus dianas de ácidos nucleicos correspondientes se realiza a una temperatura de hibridación inferior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico, o 45 donde la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con su diana de ácido nucleico correspondiente se realiza a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además proporcionar múltiples dianas de ácidos nucleicos adicionales; en donde el método comprende además: proporcionar múltiples sondas de etiqueta, cada una de las cuales comprende una etiqueta, en donde la señal de cada etiqueta no se puede distinguir de las primeras y segundas señales o entre sí; proporcionar al menos una sonda de captura para cada una de las dianas de ácidos nucleicos adicionales, hibridar en la célula cada sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula, e hibridar cada sonda de etiqueta con su sonda de captura correspondiente, y detectar la señal a partir de las etiquetas.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la primera diana de ácido nucleico y la segunda diana de ácido nucleico se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un ADN, un ARN, un ADN cromosómico, un ARNm, un ácido nucleico endógeno de la célula, un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno y un ARN citoplásmico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención,

(i) la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y donde la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm; o

5 (ii) la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y donde la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico; o

(iii) la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda diana de ácido nucleico comprende una molécula de ADN de cadena doble, el método comprende desnaturalizar el ADN de cadena doble antes de la hibridación de las primeras y segundas sondas de captura con las primeras y segundas dianas de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención,

10 (i) aproximadamente 1000 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 1000 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o

(ii) aproximadamente 100 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 100 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o

15 (iii) aproximadamente 10 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 10 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o

(iv) aproximadamente 5 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 5 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o

(v) una única copia de la primera diana de ácido nucleico y/o una única copia de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la primera diana de ácido nucleico, la segunda diana de ácido nucleico y/o la diana de ácido nucleico adicional se seleccionan del grupo que consiste en: CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Mucl, EGFR, Twist, N- Cadherina y Fibronectina.

25 Además, la presente invención proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de múltiples dianas de ácido nucleico en una célula individual en una muestra que comprende la célula, que comprende o se sospecha que comprende dichas múltiples dianas de ácido nucleico, en donde dichas dianas de ácido nucleico siempre coexisten en la célula, en donde el método comprende:

30 (a) proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, una sonda de etiqueta que comprende una etiqueta, en donde una señal de la etiqueta de una primera diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico no se puede distinguir de una señal de la etiqueta de una segunda diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico, en donde las primeras y segundas dianas de ácido nucleico son moléculas individuales;

(b) proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, al menos una sonda de captura;

(c) hibridar en la célula, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula;

35 (d) captar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de etiqueta de la sonda de captura, captando así la sonda de etiqueta de su diana de ácido nucleico correspondiente; y

(e) detectar la señal de la etiqueta de las sondas de etiqueta captadas de las múltiples dianas de ácido nucleico,

40 en donde la presencia de señal indica la presencia de un miembro de las múltiples dianas de ácido nucleico y la ausencia de señal indica la ausencia de las dianas de ácido nucleico en la célula.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las múltiples dianas de ácido nucleico comprenden genes constitutivos de distintos tejidos en una especie particular, en donde la especie es preferiblemente un humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención,

45 (i) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde cada una de dos o más sondas de captura comprende una sección T que es complementaria a una región de su diana de ácido nucleico correspondiente y una sección L que es complementaria a una región de su sonda de etiqueta correspondiente; además, las secciones T de dos o más sondas de captura son complementarias a regiones no superpuestas de la diana de ácido nucleico y las secciones L de dos o más sondas de captura son complementarias a regiones no superpuestas de la sonda de etiqueta, y donde el método comprende hibridar una
50 sonda de etiqueta con dos o más sondas de captura;

(ii) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador; y donde el método comprende hibridar una sonda de etiqueta con un amplificador e hibridar el amplificador con dichas dos o más sondas de captura; o

5 (iii) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador y un preamplificador; y donde el método comprende hibridar el preamplificador con dos o más sondas de captura, hibridar el amplificador con el preamplificador e hibridar una sonda de etiqueta con el amplificador.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende la etapa de hibridar cada conjunto de dos o más sondas de captura con el ácido nucleico diana correspondiente a una temperatura de hibridación (a) superior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto, o (b) superior a la temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende la etapa de hibridar cada conjunto de dos o más sondas de captura con el ácido nucleico diana correspondiente a una temperatura de hibridación (a) superior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto e inferior a la temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto e inferior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las múltiples dianas de ácido nucleico se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un ADN, un ARN, un ADN cromosómico, un ARNm, un ácido nucleico endógeno de la célula, un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno y ARN citoplásmicos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 5' de las secciones L, o donde dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 3' de las secciones L.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, cada etapa de hibridación o captura se logra para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula es una célula tumoral en circulación.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula se encuentra en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o donde la célula se encuentra en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la muestra que comprende la célula deriva de un fluido corporal, sangre o una sección de tejido.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, proporcionar una muestra comprende fijar y permeabilizar la célula.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende lavar la célula para retirar los materiales no captados en una de las dianas de ácido nucleico.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la detección de la señal comprende realizar citometría de flujo.

Métodos de detección de ácidos nucleicos y células

40 Detección de ácidos nucleicos en célula

45 Como se mencionó, en la presente se describen ensayos de ácido nucleico en células individuales. Por lo tanto, una primera clase general de aspectos de la descripción incluye métodos de detección de una o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende, o se sospecha que comprende, una diana de ácido nucleico. También se proporciona una sonda de etiqueta y una sonda de captura. La sonda de etiqueta puede comprender una única partícula de etiqueta o molécula que proporciona una señal detectable. La sonda de etiqueta puede tener una estructura molecular más grande que permite la unión de múltiples moléculas o partículas de etiqueta que proporcionan una señal más fuerte que una única molécula o partícula de etiqueta.

50 La sonda de captura se hibrida, en la célula, con la diana de ácido nucleico (cuando la diana de ácido nucleico está presente en la célula). La sonda de etiqueta se capta en la sonda de captura, captando así la sonda de captura en la diana de ácido nucleico. Luego se detecta la señal de la etiqueta. Dado que la etiqueta está asociada con su diana de ácido nucleico respectiva a través de las sondas de captura, la presencia de la etiqueta en la célula indica la presencia de la diana de ácido nucleico correspondiente en la célula. Los métodos son opcionalmente cuantitativos.

Por lo tanto, es posible medir la intensidad de la señal y establecer una correlación con la cantidad de la diana de ácido nucleico en la célula. Como otro ejemplo, es posible contabilizar un sitio de señal para cada copia de la diana de ácido nucleico para cuantificarlo.

5 En un aspecto, las sondas de etiqueta se unen directamente con las sondas de captura. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, se proporcionan una sonda de captura y una sonda de etiqueta. La sonda de etiqueta se hibrida con la sonda de captura, y la sonda de captura se hibrida con la diana. En otra clase de realizaciones, se proporcionan una sonda de captura y múltiples sondas de etiqueta. Las múltiples sondas de etiqueta se hibridan con la sonda de captura, y la sonda de captura se hibrida con la diana. En una clase distinta de realizaciones, se proporcionan dos o más sondas de captura y una sonda de etiqueta. Se hibridan dos o más sondas de captura con la diana de ácido nucleico. Una única sonda de etiqueta se hibrida con cada una de dos o más sondas de captura. En aun otra clase distinta de realizaciones, se proporcionan dos o más sondas de captura y múltiples sondas de etiqueta. Se hibridan dos o más sondas de captura con la diana de ácido nucleico. Cada una de las múltiples sondas de etiqueta se hibrida con cada una de dos o más sondas de captura.

15 En otro aspecto, las sondas de etiqueta se captan en las sondas de captura de manera indirecta, por ejemplo, a través de la unión de preamplificadores y/o amplificadores. En una clase de realizaciones en la cual se emplean amplificadores, se proporcionan una sonda de captura y múltiples sondas de etiqueta. Se hibrida un amplificador con la sonda de captura y las múltiples sondas de etiqueta. En una clase relacionada de realizaciones, se proporcionan una sonda de captura, múltiples sondas de etiqueta y múltiples amplificadores. Se hibridan los amplificadores con la sonda de captura y las múltiples sondas de etiqueta. En otra clase de realizaciones, se proporcionan dos o más sondas de captura y múltiples sondas de etiqueta. Se hibridan dos o más sondas de captura con la diana de ácido nucleico. Se hibrida un único amplificador con cada una de las sondas de captura y se amplifican las múltiples sondas de etiqueta con el amplificador. En aun otra clase de realizaciones, se proporcionan dos o más sondas de captura, múltiples sondas de etiqueta y múltiples amplificadores. Se hibridan dos o más sondas de captura con la diana de ácido nucleico. Se hibrida cada único amplificador con cada una de las sondas de captura y se amplifican las múltiples sondas de etiqueta con los amplificadores.

20 En una clase de realizaciones en la cual se emplean preamplificadores, se proporcionan una sonda de captura, múltiples sondas de etiqueta y múltiples amplificadores. Se hibrida un preamplificador con la sonda de captura, se hibridan múltiples amplificadores con el preamplificador, y se hibrida múltiples sondas de etiqueta con los amplificadores. En una clase relacionada de realizaciones, se proporcionan una sonda de captura, múltiples sondas de etiqueta, múltiples amplificadores y múltiples preamplificadores. Se hibridan múltiples preamplificadores con una única sonda de captura, se hibridan múltiples amplificadores con el preamplificador, y se hibrida múltiples sondas de etiqueta con los amplificadores. En otra clase de realizaciones, se proporcionan dos o más sondas de captura y múltiples sondas de etiqueta. Se hibridan dos o más sondas de captura con la diana de ácido nucleico. Se hibrida un preamplificador con cada una de dos o más sondas de captura, se hibridan múltiples amplificadores con cada uno de los preamplificadores, y se hibrida múltiples sondas de etiqueta con los amplificadores. En aun otra clase de realizaciones, se proporcionan dos o más sondas de captura, múltiples sondas de etiqueta, múltiples amplificadores y múltiples preamplificadores. Se hibridan dos o más sondas de captura con la diana de ácido nucleico. Se hibrida cada preamplificador con cada una de dos o más sondas de captura, se hibridan múltiples amplificadores con cada uno de los preamplificadores, y se hibrida múltiples sondas de etiqueta con los amplificadores.

30 En realizaciones en las cuales se emplean dos o más sondas de captura, las sondas de captura se hibridan preferiblemente con secuencias de polinucleótidos no superpuestas en su diana de ácido nucleico respectiva. Las sondas de captura pueden, aunque no necesariamente, abarcar una región contigua de la diana de ácido nucleico. Las sondas de bloqueo, polinucleótidos que se hibridan con regiones de la diana de ácido nucleico no ocupadas por las sondas de captura, se proporcionan opcionalmente y se hibridan con la diana. Para una diana de ácido nucleico determinada, las sondas de captura y sondas de bloqueo correspondientes son preferiblemente complementarias a secuencias no superpuestas físicamente distintas en la diana de ácido nucleico, las cuales son preferiblemente, aunque no necesariamente, contiguas. Al ser contiguas las sondas de captura y las sondas de bloqueo opcionales contiguas entre sí, en algunas realizaciones, pueden mejorar la resistencia de hibridación, retirar la estructura secundaria y garantizar una señal más constante y reproducible.

35 En muchas realizaciones, tales como aquellas mencionadas anteriormente, no se requiere la manipulación enzimática para captar las sondas de etiqueta en las sondas de captura. Sin embargo, en otras realizaciones, la manipulación enzimática, particularmente la amplificación de ácidos nucleicos intermedios entre las sondas de captura y las sondas de etiqueta, facilita la detección de las dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, se proporcionan múltiples sondas de etiqueta. Se produce un polinucleótido amplificado mediante amplificación por círculo rodante de un polinucleótido circular hibridado con la sonda de captura. El polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la sonda de etiqueta, y el polinucleótido amplificado, por lo tanto, comprende múltiples copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la sonda de etiqueta. Luego, las múltiples sondas de etiqueta se hibridan con el polinucleótido amplificado. Los polinucleótidos amplificados permanecen asociados (por ejemplo, de forma covalente) con la(s) sonda(s) de captura, y las sondas de etiqueta se captan así en la diana de ácido nucleico. Se puede proporcionar un polinucleótido circular e hibridarse con la sonda de captura, o se puede emplear un polinucleótido lineal que se circulariza mediante enlace luego de unirse a la

sonda de captura (por ejemplo, una sonda de candado). Las técnicas para la amplificación por círculo rodante, que incluyen el uso de sondas de candado, son conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Larsson et ál. (2004) "In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes" *Nat Methods*. 1(3):227-32, Nilsson et ál. (1994) *Science* 265:2085-2088, y Antson et ál. (2000) "PCR-generated padlock probes detect single nucleotide variation in genomic DNA" *Nucl Acids Res* 28(12):E58.

Las secuencias de sonda de captura posibles se examinan opcionalmente para determinar las posibles interacciones con las dianas de ácido nucleico no correspondientes, los preamplificadores, los amplificadores, las sondas de etiqueta y/o cualquier secuencia genómica pertinente, por ejemplo. Las secuencias que se espera que presenten hibridación cruzada con los ácidos nucleicos no deseados comúnmente no se seleccionan para su uso en las sondas de captura (pero se pueden emplear como sondas de bloqueo). El examen puede ser, por ejemplo, visual (por ejemplo, examen visual para complementariedad), informático (por ejemplo, una búsqueda BLAST de la base de datos genómica pertinente, o cálculo y comparación de energías sin unión) y/o experimental (por ejemplo, experimentos de hibridación cruzada). En general se evitan las secuencias repetitivas. Las secuencias de sondas de etiqueta preferiblemente se examinan de manera similar, para ayudar a minimizar la posible hibridación cruzada no deseada.

Una sonda de captura, preamplificador, amplificador y/o sonda de etiqueta comprende opcionalmente al menos un nucleótido no natural. Por ejemplo, una sonda de captura y un preamplificador (o amplificador o sonda de etiqueta) que se hibrida con esta comprende opcionalmente, en posiciones complementarias, al menos un par de nucleótidos no naturales que forma pares de bases entre sí pero que no forma pares de bases de Watson-Crick con las bases comunes del ADN o ARN biológico (es decir, A, C, G, T o U). Ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen, pero no se limitan a nucleótidos Locked Nucleic Acid™ (disponibles de Exiqon A/S, [www \(punto\) exiqon \(punto\) com](http://www.exiqon.com); ver, por ejemplo, SantaLucia Jr. (1998) *Proc Natl Acad Sci* 95:1460-1465) e isoG, isoC, y otros nucleótidos usados en el sistema AEGIS (Artificially Expanded Genetic Information System, disponible de EraGen Biosciences, [www \(punto\) eragen \(punto\) com](http://www.era-gen.com); ver, por ejemplo, USPN 6,001,983, USPN 6,037,120, y USPN 6,140,496). El uso de dichos pares de bases no naturales (por ejemplo, pares de bases isoG-isoC) en las sondas puede, por ejemplo, reducir la referencia y/o simplificar el diseño de sondas al disminuir la hibridación cruzada, o puede permitir el uso de sondas más cortas cuando los pares de bases no naturales presentan mayores afinidades de unión que los pares de bases naturales.

Detección multiplex de ácidos nucleicos

Como se menciona, los métodos de la invención emplean ensayos de ácidos nucleicos multiplex en células individuales, como se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, una clase general de realizaciones incluye métodos de detección de dos o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende, o se sospecha que comprende, una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. Se proporcionan una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta y una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta. También se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura.

La primera sonda de captura se hibrida, en la célula, con la primera diana de ácido nucleico (cuando la primera diana de ácido nucleico está presente en la célula), y la segunda sonda de captura se hibrida, en la célula, con la segunda diana de ácido nucleico (cuando la segunda diana de ácido nucleico está presente en la célula). La primera sonda de etiqueta se captura con la primera sonda de captura y la segunda sonda de etiqueta se captura con la segunda sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda de etiqueta con la segunda diana de ácido nucleico. Luego se detectan la primera señal de la primera etiqueta y la segunda señal de la segunda etiqueta. Dado que las primeras y segundas etiquetas están asociadas con sus dianas de ácido nucleico respectivas a través de las sondas de captura, la presencia de la(s) etiqueta(s) en la célula indica la presencia de la(s) diana(s) de ácido nucleico correspondiente(s) en la célula. Los métodos son opcionalmente cuantitativos. Por lo tanto, se pueden medir una intensidad de la primera señal y una intensidad de la segunda señal, y la intensidad de la primera señal se puede correlacionar con una cantidad de la primera diana de ácido nucleico en la célula, mientras que la intensidad de la segunda señal se correlaciona con una cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula. Como otro ejemplo, es posible contabilizar un sitio de señal para cada copia de las primeras y segundas dianas de ácido nucleico para cuantificarlo, como se describe de manera más detallada más adelante.

En un aspecto, las sondas de etiqueta se unen directamente con las sondas de captura. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, se proporcionan una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta, múltiples primeras sondas de etiqueta se hibridan con la primera sonda de captura, y se hibridan múltiples segundas sondas de etiqueta con la segunda sonda de captura. En una clase relacionada de realizaciones, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura y dos o más segundas sondas de captura, al igual que múltiples primeras sondas de etiqueta (por ejemplo, dos o más primeras sondas de etiqueta idénticas) y múltiples segundas sondas de etiqueta (por ejemplo, dos o más segundas sondas de etiqueta idénticas). Dos o más primeras sondas de captura se hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y dos o más segundas sondas de captura se hibridan con la segunda diana de

ácido nucleico. Una única primera sonda de etiqueta se hibrida con cada una de las primeras sondas de captura, y una única segunda sonda de etiqueta se hibrida con cada una de las segundas sondas de captura.

5 En otro aspecto, las sondas de etiqueta se captan en las sondas de captura de manera indirecta, por ejemplo, a través de la unión de preamplificadores y/o amplificadores. El uso de amplificadores y preamplificadores puede ser ventajoso para aumentar la potencia de la señal, dado que estos pueden facilitar la unión de grandes cantidades de sondas de etiqueta con cada diana de ácido nucleico.

10 En una clase de realizaciones en la cual se emplean los amplificadores, se proporcionan una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta. Un primer amplificador se hibrida con la primera sonda de captura y con múltiples primeras sondas de etiqueta, y un segundo amplificador se hibrida con la segunda sonda de captura y con múltiples segundas sondas de etiqueta. En otra clase de realizaciones, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta. Dos o más primeras sondas de captura se hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y dos o más segundas sondas de captura se hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Se hibrida un primer amplificador con cada una de las primeras sondas de captura y se hibridan las múltiples primeras sondas de etiqueta con los primeros amplificadores. Se hibrida un segundo amplificador con cada una de las segundas sondas de captura y se hibridan las múltiples segundas sondas de etiqueta con los segundos amplificadores.

20 En una clase de realizaciones en la cual se emplean los preamplificadores, se proporcionan una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta. Se hibrida un primer preamplificador con la primera sonda de captura, se hibridan múltiples primeros amplificadores con el primer preamplificador, y se hibrida múltiples primeras sondas de etiqueta con los primeros amplificadores. Se hibrida un segundo preamplificador con la segunda sonda de captura, se hibridan múltiples segundos amplificadores con el segundo preamplificador, y se hibrida múltiples segundas sondas de etiqueta con los segundos amplificadores. En otra clase de realizaciones, se proporcionan dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta. Dos o más primeras sondas de captura se hibridan con la primera diana de ácido nucleico, y dos o más segundas sondas de captura se hibridan con la segunda diana de ácido nucleico. Se hibrida un primer preamplificador con cada una de las primeras sondas de captura, se hibridan múltiples primeros amplificadores con cada uno de los primeros preamplificadores, y se hibrida múltiples primeras sondas de etiqueta con los primeros amplificadores. Se hibrida un segundo preamplificador con cada una de las segundas sondas de captura, se hibridan múltiples segundos amplificadores con cada uno de los segundos preamplificadores, y se hibrida múltiples segundas sondas de etiqueta con los segundos amplificadores. Opcionalmente, se pueden usar preamplificadores adicionales como intermedios entre un preamplificador hibridado con una o más sondas de captura y los amplificadores.

35 En las clases anteriores de realizaciones, una sonda de captura se hibrida con cada sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador. En clases alternativas de realizaciones relacionadas, dos o más sondas de captura se hibridan con la sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador. Ver, por ejemplo, la sección que figura más adelante que se titula «Implementación, aplicaciones y ventajas».

40 En realizaciones en las cuales se emplean dos o más primeras sondas de captura y/o dos o más segundas sondas de captura, las sondas de captura se hibridan preferiblemente con secuencias de polinucleótidos no superpuestas en sus dianas de ácido nucleico respectivas. Las sondas de captura pueden, aunque no necesariamente, abarcar una región contigua de la diana de ácido nucleico. Las sondas de bloqueo, polinucleótidos que se hibridan con regiones de la diana de ácido nucleico no ocupadas por las sondas de captura, se proporcionan opcionalmente y se hibridan con la diana. Para una diana de ácido nucleico determinada, las sondas de captura y sondas de bloqueo correspondientes son preferiblemente complementarias a secuencias no superpuestas físicamente distintas en la diana de ácido nucleico, las cuales son preferiblemente, aunque no necesariamente, contiguas. Al ser contiguas las sondas de captura y las sondas de bloqueo opcionales contiguas entre sí, en algunas realizaciones, pueden mejorar la resistencia de hibridación, retirar la estructura secundaria y garantizar una señal más constante y reproducible.

50 En muchas realizaciones, tales como aquellas mencionadas anteriormente, no se requiere la manipulación enzimática para captar las sondas de etiqueta en las sondas de captura. Sin embargo, en otras realizaciones, la manipulación enzimática, particularmente la amplificación de ácidos nucleicos intermedios entre las sondas de captura y las sondas de etiqueta, facilita la detección de las dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, se proporcionan múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta. Se produce un primer polinucleótido amplificado mediante amplificación por círculo rodante de un primer polinucleótido circular hibridado con la primera sonda de captura. El primer polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la primera sonda de etiqueta, y el primer polinucleótido amplificado, por lo tanto, comprende múltiples copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la primera sonda de etiqueta. Luego, las múltiples primeras sondas de etiqueta se hibridan con el primer polinucleótido amplificado. De manera similar, se produce un segundo polinucleótido amplificado mediante amplificación por círculo rodante de un segundo polinucleótido circular hibridado con la segunda sonda de captura (preferiblemente, al mismo tiempo que se produce el primer polinucleótido

amplificado). El segundo polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda de etiqueta, y el segundo polinucleótido amplificado, por lo tanto, comprende múltiples copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda de etiqueta. Luego, las múltiples segundas sondas de etiqueta se hibridan con el segundo polinucleótido amplificado. Los polinucleótidos amplificados permanecen asociados (por ejemplo, de forma covalente) con la(s) sonda(s) de captura, y las sondas de etiqueta se captan así en las dianas de ácido nucleico. Se puede proporcionar un polinucleótido circular e hibridarse con la sonda de captura, o se puede emplear un polinucleótido lineal que se circulariza mediante enlace luego de unirse a la sonda de captura (por ejemplo, una sonda de candado). Las técnicas para la amplificación por círculo rodante, que incluyen el uso de sondas de candado, son conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Larsson et ál. (2004) "In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes" *Nat Methods*. 1(3):227-32, Nilsson et ál. (1994) *Science* 265:2085-2088, y Antson et ál. (2000) "PCR-generated padlock probes detect single nucleotide variation in genomic DNA" *Nucl Acids Res* 28(12):E58.

Las secuencias de sonda de captura posibles se examinan opcionalmente para determinar las posibles interacciones con las dianas de ácido nucleico no correspondientes, los preamplificadores, los amplificadores, las sondas de etiqueta y/o cualquier secuencia genómica pertinente, por ejemplo. Las secuencias que se espera que presenten hibridación cruzada con los ácidos nucleicos no deseados comúnmente no se seleccionan para su uso en las sondas de captura (pero se pueden emplear como sondas de bloqueo). El examen puede ser, por ejemplo, visual (por ejemplo, examen visual para complementariedad), informático (por ejemplo, una búsqueda BLAST de la base de datos genómica pertinente, o cálculo y comparación de energías sin unión) y/o experimental (por ejemplo, experimentos de hibridación cruzada). En general se evitan las secuencias repetitivas. Las secuencias de sondas de etiqueta preferiblemente se examinan de manera similar, para ayudar a minimizar la posible hibridación cruzada no deseada.

Una sonda de captura, preamplificador, amplificador y/o sonda de etiqueta comprende opcionalmente al menos un nucleótido no natural. Por ejemplo, una sonda de captura y un preamplificador (o amplificador o sonda de etiqueta) que se hibrida con esta comprende opcionalmente, en posiciones complementarias, al menos un par de nucleótidos no naturales que forma pares de bases entre sí pero que no forma pares de bases de Watson-Crick con las bases comunes del ADN o ARN biológico (es decir, A, C, G, T o U). Ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen, pero no se limitan a nucleótidos Locked Nucleic Acid™ (disponibles de Exiqon A/S, [www \(punto\) exiqon \(punto\) com](http://www.exiqon.com); ver, por ejemplo, SantaLucia Jr. (1998) *Proc Natl Acad Sci* 95:1460-1465) e isoG, isoC, y otros nucleótidos usados en el sistema AEGIS (Artificially Expanded Genetic Information System, disponible de EraGen Biosciences, [www \(punto\) eragen \(punto\) com](http://www.era-gen.com); ver, por ejemplo, USPN 6,001,983, USPN 6,037,120, y USPN 6,140,496). El uso de dichos pares de bases no naturales (por ejemplo, pares de bases isoG-isoC) en las sondas puede, por ejemplo, reducir la referencia y/o simplificar el diseño de sondas al disminuir la hibridación cruzada, o puede permitir el uso de sondas más cortas cuando los pares de bases no naturales presentan mayores afinidades de unión que los pares de bases naturales.

Como se mencionó, los métodos son útiles para la detección multiplex de ácidos nucleicos, que incluye la detección simultánea de más de dos dianas de ácido nucleico. Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende una tercera diana de ácido nucleico, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una tercera sonda de etiqueta que comprende una tercera etiqueta, en donde una tercera señal de la tercera etiqueta se puede distinguir de las primeras y segundas señales, proporcionar al menos una tercera sonda de captura, hibridar en la célula la tercera sonda de captura con la tercera diana de ácido nucleico (cuando la tercera diana está presente en la célula), captar la tercera sonda de etiqueta en la tercera sonda de captura y detectar la tercera señal a partir de la tercera etiqueta. De manera similar, se detectan simultáneamente en la célula la cuarta, quinta, sexta, etc. diana de ácido nucleico, si se desea.

Una diana de ácido nucleico puede ser básicamente cualquier ácido nucleico que se detecta de manera deseada en la célula. Por ejemplo, una diana de ácido nucleico puede ser un ADN, un ADN cromosómico, un ARN (por ejemplo, un ARN citoplásmico), un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico o similar. La diana de ácido nucleico puede ser un ácido nucleico endógeno de la célula. Como otro ejemplo, la diana puede ser un ácido nucleico que se introduce o expresa en la célula mediante infección de la célula con un patógeno, por ejemplo, un ARN o ADN genómico viral o bacteriano, un plásmido, un ARNm viral o bacteriano, o similar.

Las primeras y segundas dianas de ácido nucleico (y/o terceras, cuartas, etc. opcionales) pueden formar parte de una única molécula de ácido nucleico, o pueden ser moléculas individuales. Se describen varias ventajas y aplicaciones de ambos enfoques de manera más detallada más adelante y en la sección titulada «Implementación, aplicaciones y ventajas». En una clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm. De manera alternativa, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera región de un ARNm y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda región del mismo ARNm; este enfoque puede aumentar la especificidad de detección del ARNm. En otra clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico. Las primeras y segundas secuencias de polinucleótidos de ADN cromosómico se ubican opcionalmente en el mismo cromosoma, por ejemplo, dentro del mismo gen, o en distintos cromosomas.

Los métodos permiten la detección de incluso dianas de cantidad baja o de una sola copia. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, aproximadamente 1000 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 1000 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula (por ejemplo, aproximadamente 100 copias o menos, aproximadamente 50 copias o menos, aproximadamente 10 copias o menos, aproximadamente 5 copias o menos, o incluso una única copia).

En un aspecto, se normalizan una o más señales de una o más dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, la segunda diana de ácido nucleico comprende un ácido nucleico de referencia, y el método incluye normalizar la primera señal con la segunda señal. El ácido nucleico de referencia es un ácido nucleico seleccionado como un estándar de comparación. Será evidente que la elección del ácido nucleico de referencia puede depender de la aplicación deseada. Por ejemplo, para el análisis de expresión génica, en donde las primeras y terceras, cuartas, etc. dianas de ácido nucleico opcionales son ARNm cuyos niveles de expresión deben determinarse, el ácido nucleico de referencia puede ser un ARNm transcrito de un gen constitutivo. Como otro ejemplo, la primera diana de ácido nucleico puede ser un ARNm cuya expresión se modifica en un estado patológico, por ejemplo, un ARNm expresado en una célula tumoral y no en una célula normal o expresado en un nivel superior en una célula tumoral en comparación con una célula normal, mientras que la segunda diana de ácido nucleico es un ARNm expresado a partir de un gen constitutivo o un gen similar cuya expresión no se modifica en el estado patológico. Como otro ejemplo, la primera diana de ácido nucleico puede ser una secuencia de ADN cromosómico que se amplifica o elimina en una célula tumoral, mientras que la segunda diana de ácido nucleico es otra secuencia de ADN cromosómico que se mantiene en su cantidad de copias normal en la célula tumoral. En la presente se describen ejemplos de ácidos nucleicos de referencia y muchos más son conocidos en la técnica.

Opcionalmente, los resultados de la célula se comparan con los resultados de una célula de referencia. Es decir, las primeras y segundas dianas también se detectan en una célula de referencia, por ejemplo, una célula no tumoral, no infectada u otra célula normal sana, seleccionada como un estándar de comparación dependiendo de la aplicación deseada. Las señales se pueden normalizar con un ácido nucleico de referencia como se indicó anteriormente. Simplemente como un ejemplo, la primera diana de ácido nucleico puede ser el gen Her-2, con el objetivo de medir la amplificación del gen Her-2. La señal de Her-2 se puede normalizar con la de un gen de referencia, cuya cantidad de copias se mantiene de forma estable en el ADN genómico. La señal normalizada para el gen Her-2 de una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral o célula tumoral sospechada) se puede comparar con la señal normalizada de una célula de referencia (por ejemplo, una célula normal), para determinar la cantidad de copias en la célula cancerosa en comparación con las células normales.

La etiqueta (primera, segunda, tercera, etc.) puede ser básicamente cualquier etiqueta conveniente que proporcione, directa o indirectamente, una señal detectable. En un aspecto, la primera etiqueta es una primera etiqueta fluorescente y la segunda etiqueta es una segunda etiqueta fluorescente. Por lo tanto, la detección de la señal de las etiquetas comprende detectar las señales fluorescentes de las etiquetas. Una variedad de etiquetas fluorescentes cuyas señales pueden distinguirse entre sí son conocidas, que incluyen, por ejemplo, fluoróforos y puntos cuánticos. Como otros ejemplos, la etiqueta puede ser una etiqueta luminiscente, una etiqueta de dispersión lumínica (por ejemplo, partículas de oro coloidal) o una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante).

Los métodos se pueden usar para detectar la presencia de las dianas de ácido nucleico en las células de básicamente cualquier tipo de muestra. Por ejemplo, la muestra se puede obtener de un fluido corporal, un desecho corporal, sangre, médula ósea, esputo, orina, ganglio linfático, heces, secreciones vaginales, prueba de PAP de cuello uterino, muestra oral u otra muestra, fluido espinal, saliva, esputo, fluido eyaculatorio, semen, fluido linfático, un fluido intercelular, un tejido (por ejemplo, un homogenado de tejido o sección de tejido), una biopsia y/o un tumor. La muestra y/o la célula pueden obtenerse de uno o más de un humano, un animal, una planta y una célula cultivada. Las muestras obtenidas de incluso volúmenes relativamente grandes de materiales, tales como fluido corporal o desecho corporal, pueden analizarse en los métodos de la invención, y el retiro de dichos materiales es relativamente no invasivo. Las muestras opcionalmente se toman de un paciente, según métodos de laboratorio estándar después del consentimiento informado.

Los métodos para la detección de dianas de ácido nucleico en las células se pueden usar para identificar las células. Por ejemplo, es posible identificar una célula como de un tipo deseado en función de qué ácidos contiene, y en qué nivel. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, los métodos incluyen la identificación de la célula como una célula diana deseada en función de la detección de las primeras y segundas señales (y terceras, cuartas, etc. señales opcionales) desde el interior de la célula. La célula se puede identificar en función de la presencia de las dianas de ácido nucleico. De manera similar, la célula se puede identificar en función de la potencia de señal relativa o del nivel de expresión de una o más de las dianas de ácido nucleico. Las señales se normalizan opcionalmente como se indicó anteriormente y/o se comparan con las de una célula de referencia.

Los métodos se pueden aplicar a la detección e identificación de tipos de células raros. Por lo tanto, la muestra que incluye la célula puede ser una mezcla de células diana deseadas y otras células no diana que pueden estar presentes más que las células diana. Por ejemplo, la relación de células diana a células de todos los otros tipos en la muestra es opcionalmente inferior a 1:1x10⁴, inferior a 1:1x10⁵, inferior a 1:1x10⁶, inferior a 1:1x10⁷, inferior a 1:1x10⁸ o incluso inferior a 1:1x10⁹.

Básicamente cualquier tipo de célula que se puede diferenciar en función de su contenido de ácido nucleico (presencia, ausencia o nivel de expresión o cantidad de copias de uno o más ácidos nucleicos) se puede detectar e identificar usando los métodos y una elección adecuada de dianas de ácido nucleico. Como algunos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral en circulación u otra célula tumoral, una célula infectada por virus, una célula fetal en la sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (por ejemplo, sangre u otro fluido corporal), una célula endotelial, una célula endotelial precursora o una célula del miocardio en sangre, una célula madre o un linfocito T. Los tipos de células raras pueden enriquecerse antes de realizar los métodos, si fuera necesario, mediante los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, lisis de glóbulos rojos, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, enriquecimiento adicional de células diana raras mediante separación de células activadas de forma magnética (MACS), etc.). Los métodos se combinan opcionalmente con otras técnicas, tales como tinción con DAPI para ADN nuclear o análisis de morfología celular. Será evidente que opcionalmente se detecta una variedad de distintos tipos de marcadores de ácidos nucleicos de manera simultánea mediante los métodos y se usan para identificar la célula. Por ejemplo, es posible identificar una célula en función de la presencia o del nivel de expresión relativa de una diana de ácido nucleico en la célula y la ausencia de otra diana de ácido nucleico de la célula, por ejemplo, una célula tumoral en circulación se puede identificar mediante la presencia o el nivel de uno o más marcadores que se encuentran en la célula tumoral y no se encuentran (o se encuentran en distintos niveles) en células sanguíneas, y su identidad se puede confirmar mediante la ausencia de uno o más marcadores presentes en las células sanguíneas y no en las células tumorales en circulación. El principio puede extenderse al uso de cualquier otro tipo de marcador, tales como marcadores basados en proteínas en células individuales.

La célula se fija y permeabiliza comúnmente antes de la hibridación de las sondas de captura, para conservar las dianas de ácido nucleico en la célula y para permitir que las sondas de captura, sondas de etiqueta, etc. ingresen en la célula. La célula se lava opcionalmente para retirar los materiales no captados en una de las dianas de ácido nucleico. La célula puede lavarse después de cualquiera de varias etapas, por ejemplo, después de la hibridación de las sondas de captura con las dianas de ácido nucleico para retirar las sondas de captura no unidas, después de la hibridación de los preamplificadores, amplificadores y/o sondas de etiqueta con las sondas de captura, y/o similares.

Las diversas etapas de captura e hibridación se pueden realizar de manera simultánea o secuencial, básicamente en cualquier orden conveniente. preferiblemente, se logra una etapa de hibridación determinada para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo. Por ejemplo, todas las sondas de captura (primeras, segundas, etc.) pueden agregarse a la célula de una vez y se puede permitir que se hibriden con sus dianas correspondientes, la célula puede lavarse, los amplificadores (primeros, segundos, etc.) se pueden hibridar con las sondas de captura correspondientes, la célula se puede lavar, las sondas de etiqueta (primeras, segundas, etc.) se pueden hibridar con los amplificadores correspondientes, y la célula luego se puede lavar nuevamente antes de la detección de las etiquetas. Como otro ejemplo, las sondas de captura se pueden hibridar con las dianas, la célula se puede lavar, los amplificadores y las sondas de etiqueta se pueden agregar juntos y se pueden hibridar, y la célula luego se puede lavar antes de la detección. Será evidente que una o más dianas de ácido nucleico de cadena doble son preferiblemente desnaturalizadas, por ejemplo, por calor, antes de la hibridación de una o más sondas de captura correspondientes con una o más dianas.

En algunas realizaciones, la célula se encuentra en suspensión en todas o la mayoría de las etapas del método, para facilitar la manipulación. Sin embargo, los métodos también pueden aplicarse a las células en muestras de tejido sólido (por ejemplo, secciones de tejido) y/o células inmovilizadas en un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos u otra superficie). Por lo tanto, en una clase de realizaciones, la célula se encuentra en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o la célula se encuentra en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. Por ejemplo, la célula puede encontrarse en suspensión en la muestra y durante las etapas de hibridación, captura, lavado opcional y detección. En otras realizaciones, la célula se encuentra en suspensión en la muestra que comprende la célula, y la célula se fija en un sustrato durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. Por ejemplo, la célula puede encontrarse en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y lavado opcional y se inmoviliza en un sustrato durante la etapa de detección. En otras realizaciones, la muestra comprende una sección de tejido.

Las señales de las etiquetas se pueden detectar, y opcionalmente se pueden medir sus intensidades, mediante cualquiera de diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, en realizaciones en las que la célula se encuentre en suspensión, las primeras y segundas (y terceras, etc. opcionales) señales se pueden detectar de manera conveniente mediante citometría de flujo. En realizaciones en las que las células se inmovilizan en un sustrato, las primeras y segundas (y terceras, etc. opcionales) señales se pueden detectar, por ejemplo, mediante escáner láser o microscopio, por ejemplo, un microscopio fluorescente o de dispersión automático. Como se indicó, la detección se encuentra a nivel de células individuales. Las señales de las etiquetas se detectan comúnmente en una única operación (por ejemplo, una única ejecución de citometría de flujo o una única sesión de microscopio o análisis), en lugar de secuencialmente en operaciones individuales para cada etiqueta. Dicha única operación de detección puede, por ejemplo, implicar el cambio de los filtros ópticos entre la detección de las distintas etiquetas, pero no implica la detección de la primera etiqueta seguido de la captura de la segunda etiqueta y luego la detección de la segunda etiqueta. En algunas realizaciones, las primeras y segundas (y terceras, etc. opcionales) etiquetas son captadas en sus dianas respectivas de manera simultánea, pero se detectan en etapas u operaciones de detección individuales.

Las características adicionales que se describen en la presente, por ejemplo, en la sección que figura más adelante titulada «Implementación, aplicaciones y ventajas» se pueden aplicar a los métodos, según sea pertinente. Por ejemplo, como se describe de manera más detallada más adelante, una sonda de etiqueta puede incluir más de una etiqueta, idéntica o distinta. La potencia de la señal se ajusta opcionalmente entre las dianas dependiendo de su cantidad de copias esperada, si se deseara; por ejemplo, la señal para un ARNm expresado a niveles bajos se puede amplificar hasta un mayor grado (por ejemplo, mediante el uso de más etiquetas por sonda de etiqueta y/o el uso de preamplificadores y amplificadores para captar más sondas de etiqueta por copia de la diana) que la señal para un ARNm muy expresado.

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

Detección de dianas de ácido nucleico usando etiquetas distinguibles o etiquetas no distinguibles

Como se menciona, los métodos de la invención emplean ensayos de ácidos nucleicos multiplex en células individuales, como se define en las reivindicaciones. Una clase general de realizaciones incluye métodos de detección de dos o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende, o se sospecha que comprende, una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. Se proporcionan una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta y una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta. También se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura.

Por ejemplo, la primera señal de la primera etiqueta es distinguible de una segunda señal de la segunda etiqueta, para que la primera diana de ácido nucleico y la segunda diana de ácido nucleico puedan detectarse de manera independiente. En una realización, la primera señal de la primera etiqueta no puede distinguirse de una segunda señal de la segunda etiqueta. Esta realización es beneficiosa en muchas aplicaciones distintas. En un ejemplo de aplicación, las primeras y segundas dianas de ácido nucleico siempre coexisten en determinadas células y la señal producida por las dos dianas de manera combinada es mucho más fuerte que la de una de las dianas. En otro ejemplo de aplicación, es deseable detectar la presencia de la primera y segunda diana de ácido nucleico en la célula. El uso de la misma etiqueta o una etiqueta no distinguible permite dicha detección sin aumentar la complejidad del instrumento de lectura. En aun otro ejemplo de aplicación, es deseable detectar o identificar un tipo específico de célula entre una población celular mixta en función de la presencia o cantidad de algunas dianas de ácido nucleico únicas en la célula. Dado que la cantidad o incluso la presencia de una única diana de ácido nucleico puede no ser estable dentro de la célula diana, el uso de una única diana de ácido nucleico como marcador afectará la fiabilidad de la identificación de la célula. Dos o más dianas con etiqueta no distinguible pueden producir una señal mucho más estable, lo que conlleva una identificación más fiable. En un ejemplo más específico, las células tumorales en circulación (CTC) deben detectarse a partir de una muestra de sangre.

El ARNm de citoqueratinas 19 (CK19) se usa comúnmente como marcador para distinguir las CTC de otras células sanguíneas normales. Sin embargo, hemos descubierto que el nivel de expresión de CK19 no es estable en todas las CTC. Dado que las CTC son tan raras, esta fluctuación afectará la fiabilidad de la detección de CTC. Al adoptar múltiples dianas de ARN en la familia CK como el marcador de CTC y etiquetarlas con la misma etiqueta, la señal marcadora puede ser mucho más estable y la fiabilidad de la detección de CTC mejora enormemente. En una realización específica de esta aplicación particular, se usan ARN CK8, 18 y 19 como grupo diana «pan-CK» y se etiquetan con la misma etiqueta para la detección de CTC en fluidos corporales.

Este uso de etiquetas que producen señales no distinguibles que se describió anteriormente tiene muchas más aplicaciones específicas. A continuación, se describen dos ejemplos de realizaciones:

Detección de un grupo deseado de subtipos de papilomavirus humano (HPV)

El HPV es una familia de más de 100 subtipos virales. Un grupo de estos subtipos se considera de «riesgo elevado» de provocar cáncer de cuello uterino, que incluye PV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. Recientemente, se ha descubierto que otro grupo tiene riesgo elevado de provocar cáncer de cabeza y cuello, que incluye HPV-16, 18, 31, 33, 35, 52 y 58. Es valioso en términos clínicos que una prueba de diagnóstico detecte la presencia de estos grupos de riesgo elevado (HR, por sus siglas en inglés) de HPV en una muestra clínica para acceder al riesgo de avanzar hasta convertirse en cáncer. Un enfoque para desarrollar dicha prueba de diagnóstico es detectar cada subtipo específico de manera individual, lo que será muy costoso y requiere una gran cantidad de muestras. Un segundo enfoque sería encontrar una secuencia común entre los miembros del grupo y diseñar un conjunto de sondas que se dirigen a esta secuencia común. El problema con el segundo enfoque es que dicha secuencia común puede ser demasiado corta. Además, existen muchas situaciones en las que los miembros de este grupo de riesgo elevado pueden cambiar. Por ejemplo, puede surgir un nuevo subtipo de HR. Además, el grupo de HR para distintos cánceres, es decir, cáncer de cuello uterino y cáncer de cabeza y cuello, tiene distintos miembros. A menudo, es deseable en términos clínicos dividir aun más el grupo de HR en el grupo de mayor riesgo y el resto.

La forma de dividir el grupo de HR puede ser diferente, dependiendo de las regiones en distintas partes del mundo. Por ejemplo, en Estados Unidos, HPV-16 es definitivamente el miembro de mayor riesgo del grupo de HR para el cáncer de cuello uterino. Pero en Asia, HPV-16 y 45 son ambos muy prominentes. Usando el segundo enfoque, el conjunto de sondas y posiblemente las condiciones de ensayo deben volver a diseñarse y reoptimizarse para adaptarse a cualquiera de los cambios descritos anteriormente. Esta solicitud usa un nuevo y distinto enfoque: los conjuntos de sondas se diseñan para detectar de manera específica cada subtipo de riesgo elevado individual. Las etiquetas en cada conjunto de sondas generan la misma señal no distinguible. Dependiendo de la membresía del grupo que se deba detectar, sus conjuntos de sondas correspondientes se agrupan para que se convierta en el conjunto de sondas para el grupo. Si algún miembro del grupo está presente en la muestra, se detectará la presencia del grupo. Una de las ventajas de este diseño es que la composición de los miembros del grupo puede cambiar sin volver a diseñar el conjunto de sondas o los parámetros del ensayo.

Proporcionar un control positivo más estable

La mayoría de las pruebas de diagnóstico requieren realizar una prueba de control positivo paralelo, que proporcione una indicación del éxito del ensayo. Para la detección de ARN in situ, en particular, siempre existe la preocupación de la degradación de ARN en la muestra. Una prueba de control positivo bien diseñada también puede proporcionar una medida de la calidad del ARN en la muestra. La diana de una prueba de control positivo es normalmente un gen constitutivo, tal como Ubc. Un gen constitutivo ideal sería un agente de expresión medio estable en todos los tipos de órganos en una muestra particular, tal como humana. Sin embargo, en la realidad, el nivel de expresión de cualquier gen constitutivo cambia de órgano a órgano. En algunos órganos, la expresión puede ser demasiado baja para que sea útil. La presente invención resuelve este problema al usar un conjunto de múltiples etiquetas de genes constitutivos con señales no distinguibles. Se puede lograr un control positivo más estable en una mayor variedad de órganos.

Detección de niveles relativos según normalización con los ácidos nucleicos de referencia

Como se describió de manera resumida anteriormente, la señal detectada para un ácido nucleico de interés se puede normalizar con la de un ácido nucleico de referencia. En la presente se describen métodos de ensayo de un nivel relativo de uno o más ácidos nucleicos diana en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende, o se sospecha que comprende, un primer ácido nucleico diana, y comprende un segundo ácido nucleico de referencia. También se proporcionan una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una primera señal de la primera etiqueta se puede distinguir de una segunda señal de la segunda etiqueta. En la célula, la primera sonda de etiqueta se capta en el primer ácido nucleico diana (cuando el primer ácido nucleico diana está presente en la célula) y la segunda sonda de etiqueta se capta en el segundo ácido nucleico de referencia. La primera señal de la primera etiqueta y la segunda señal de la segunda etiqueta luego se detectan en la célula individual, y se mide la intensidad de cada señal. La intensidad de la primera señal se normaliza con la intensidad de la segunda señal (de referencia). El nivel del primer ácido nucleico diana con respecto al nivel del segundo ácido nucleico de referencia en la célula se analiza de este modo, dado que las primeras y segundas etiquetas está asociadas con sus ácidos nucleicos respectivos. Los métodos son opcionalmente cuantitativos, lo que permite la medición de la cantidad del primer ácido nucleico diana con respecto a la cantidad del segundo ácido nucleico de referencia en la célula. Por lo tanto, la intensidad de la primera señal normalizada con la de la segunda señal se puede correlacionar con una cantidad del primer ácido nucleico diana presente en la célula. Es muy deseable que el ácido nucleico de referencia sea estable en distintas células y/o en distintos tipos de células. Sin embargo, es difícil encontrar dicho ácido nucleico individual. Como hemos descrito anteriormente, el segundo ácido nucleico puede ser un grupo de muchos ácidos nucleicos y los conjuntos de sondas para cada miembro del grupo transportan la señal no distinguible. La señal del grupo entonces puede ser más estable en distintas células y/o tipos de células.

Las sondas de etiqueta se pueden unir directamente a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, la primera sonda de etiqueta se puede hibridar con el primer ácido nucleico diana y/o la segunda sonda de etiqueta se puede hibridar con el segundo ácido nucleico de referencia. De manera alternativa, algunas o todas las sondas de etiqueta pueden unirse indirectamente a sus ácidos nucleicos correspondientes, por ejemplo, a través de sondas de captura. Por ejemplo, las primeras y segundas sondas de etiqueta pueden unirse directamente a los ácidos nucleicos, o una puede unirse directamente mientras que la otra se une indirectamente, o ambas pueden unirse indirectamente.

Las sondas de etiqueta se captan opcionalmente en los ácidos nucleicos mediante sondas de captura. En una clase de realizaciones, se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura. En la célula, la primera sonda de captura se hibrida con el primer ácido nucleico diana y la segunda sonda de captura se hibrida con el segundo ácido nucleico de referencia. La primera sonda de etiqueta se captura con la primera sonda de captura y la segunda sonda de etiqueta se captura con la segunda sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta con el primer ácido nucleico diana y la segunda sonda de etiqueta con el segundo ácido nucleico de referencia. Las características descritas para los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, con respecto a la configuración y la cantidad de las sondas de etiqueta y captura, uso opcional de preamplificadores y/o amplificadores, amplificación por círculo rodante de polinucleótidos circulares, y similares.

Los métodos se pueden usar para la detección multiplex de ácidos nucleicos, que incluyen la detección simultánea de dos o más ácidos nucleicos diana. Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende un tercer ácido nucleico diana, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una tercera sonda de etiqueta que comprende una tercera etiqueta, en donde una tercera señal de la tercera etiqueta puede distinguirse de las primeras y segundas señales; captar, en la célula, la tercera sonda de etiqueta con el tercer ácido nucleico diana (cuando está presente en la célula); detectar la tercera señal de la tercera etiqueta, dicha detección comprende medir una intensidad de la tercera señal; y normalizar la intensidad de la tercera señal con la intensidad de la segunda señal. De manera alternativa, la tercera señal se puede normalizar con la de un ácido nucleico de referencia distinto. De manera similar, se detectan simultáneamente en la célula los cuartos, quintos, sextos, etc. ácidos nucleicos, si se desea. Las terceras, cuartas, quintas, etc. sondas de etiqueta se hibridan opcionalmente de manera directa con su ácido nucleico correspondiente, o se pueden captar indirectamente mediante sondas de captura como se describe para las primeras y segundas sondas de etiqueta.

Los métodos se pueden usar para el análisis de expresión génica, detección de amplificación o eliminación génica o detección o diagnóstico de enfermedad, solo como algunos ejemplos. Un ácido nucleico diana puede ser básicamente cualquier ácido nucleico que se detecta de manera deseada en la célula. Por ejemplo, un ácido nucleico diana puede ser un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico o similar. El ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico endógeno de la célula, o como otro ejemplo, la diana puede ser un ácido nucleico que se introduce o expresa en la célula mediante infección de la célula con un patógeno, por ejemplo, un ARN o ADN genómico viral o bacteriano, un plásmido, un ARNm viral o bacteriano, o similar. El ácido nucleico de referencia puede ser, de manera similar, un ADN, un ARNm, un ADN cromosómico, un ARNm, un ARN endógeno de la célula, o similar.

Como se describió anteriormente, la elección del ácido nucleico de referencia puede depender de la aplicación deseada. Por ejemplo, para el análisis de expresión génica, en donde los primeros y terceros, cuartos, etc. ácidos nucleicos opcionales son ARNm cuyos niveles de expresión deben determinarse, el ácido nucleico de referencia puede ser un ARNm transcrito de un gen constitutivo. Como otro ejemplo, el primer ácido nucleico diana puede ser un ARNm cuya expresión se modifica en un estado patológico, por ejemplo, un ARNm expresado en una célula tumoral y no en una célula normal o expresado en un nivel superior en una célula tumoral en comparación con una célula normal, mientras que el ácido nucleico de referencia es un ARNm expresado a partir de un gen constitutivo o un gen similar cuya expresión no se modifica en el estado patológico. En un ejemplo similar, el ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico viral o bacteriano, mientras que el ácido nucleico de referencia es endógeno de la célula. Como otro ejemplo, el primer ácido nucleico diana puede ser una secuencia de ADN cromosómico que se amplifica o elimina en una célula tumoral, mientras que el ácido nucleico de referencia es otra secuencia de ADN cromosómico que se mantiene en su cantidad de copias normal en la célula tumoral. En la presente se describen ejemplos de ácidos nucleicos de referencia y muchos más son conocidos en la técnica.

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

Opcionalmente, los resultados normalizados de la célula se comparan con los resultados normalizados de una célula de referencia. Es decir, los ácidos nucleicos diana y de referencia también se detectan en una célula de referencia, por ejemplo, una célula no tumoral, no infectada u otra célula normal sana, seleccionada como un estándar de comparación dependiendo de la aplicación deseada. Simplemente como un ejemplo, el primer ácido nucleico diana puede ser el gen Her-2, con el objetivo de medir la amplificación del gen Her-2. La señal de Her-2 se puede normalizar con la de un gen de referencia, cuya cantidad de copias se mantiene de forma estable en el ADN genómico. La señal normalizada para el gen Her-2 de una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral o célula tumoral sospechada) se puede comparar con la señal normalizada de una célula de referencia (por ejemplo, una célula normal), para determinar la cantidad de copias en la célula cancerosa en comparación con las células normales.

La potencia de la señal se ajusta opcionalmente entre los ácidos nucleicos diana y de referencia dependiendo de sus cantidades de copias esperadas, si se desea. Por ejemplo, la señal para un ARNm diana expresado en niveles bajos se puede amplificar hasta un mayor grado (por ejemplo, mediante el uso de más etiquetas por sonda de etiqueta y/o el uso de sondas de captura, preamplificadores y amplificadores para captar más sondas de etiqueta por copia de la diana) que la señal para un ARNm muy expresado (que, por ejemplo, puede detectarse mediante unión directa de la sonda de etiqueta con el ácido nucleico de referencia, mediante el uso de sondas de captura y amplificador sin preamplificador, o similar).

Los métodos para el análisis de niveles relativos de ácidos nucleicos diana en las células se pueden usar para identificar las células. Por ejemplo, es posible identificar una célula como de un tipo deseado en función de qué ácidos nucleicos contiene, y en qué nivel. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, los métodos incluyen la identificación de la célula como una célula diana deseada en función de la primera señal (y terceras, cuartas, etc. señales normalizadas opcionales). Como se describe en la presente, la célula se puede identificar en función de la

presencia o ausencia de uno o más de los ácidos nucleicos diana. De manera similar, la célula se puede identificar en función de la potencia de señal relativa o del nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos diana. Las señales se comparan opcionalmente con las de una célula de referencia.

5 Los métodos se pueden aplicar a la detección e identificación de tipos de células raras. Por lo tanto, la muestra que incluye la célula puede ser una mezcla de células diana deseadas y otras células no diana que pueden estar presentes más que las células diana. Por ejemplo, la relación de células diana a células de todos los otros tipos en la muestra es opcionalmente inferior a 1:1x10⁴, inferior a 1:1x10⁵, inferior a 1:1x10⁶, inferior a 1:1x10⁷, inferior a 1:1x10⁸ o incluso inferior a 1:1x10⁹.

10 Básicamente cualquier tipo de célula que se puede diferenciar en función de su contenido de ácido nucleico (presencia, ausencia o cantidad de copias de uno o más ácidos nucleicos) se puede detectar e identificar usando los métodos y una elección adecuada de ácidos nucleicos diana y de referencia. Como algunos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral en circulación u otra célula tumoral, una célula infectada por virus, una célula fetal en la sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (por ejemplo, sangre u otro fluido corporal), una célula endotelial, una célula endotelial precursora o una célula del miocardio en sangre. Los tipos de células raras pueden enriquecerse antes de realizar los métodos, si fuera necesario, mediante los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, lisis de glóbulos rojos, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, etc.). Los métodos se combinan opcionalmente con otras técnicas, tales como tinción con DAPI para ADN nuclear. Será evidente que opcionalmente se detecta una variedad de distintos tipos de marcadores de ácidos nucleicos de manera simultánea mediante los métodos y se usan para identificar la célula. Por ejemplo, es posible identificar una célula en función de la presencia o del nivel de expresión relativa de un ácido nucleico diana en la célula y la ausencia de otro ácido nucleico diana de la célula, por ejemplo, una célula tumoral en circulación se puede identificar mediante la presencia o el nivel de uno o más marcadores que se encuentran en la célula tumoral y no se encuentran (o se encuentran en distintos niveles) en células sanguíneas, y mediante la ausencia de uno o más marcadores presentes en las células sanguíneas y no en las células tumorales en circulación. El principio puede extenderse al uso de cualquier otro tipo de marcador, tales como marcadores basados en proteínas en células individuales.

30 Básicamente todas las características mencionadas de los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto al origen de la muestra, fijación y permeabilización de la célula, lavado de la célula, desnaturalización de diana de cadena doble y ácidos nucleicos de referencia, tipo de etiquetas, uso de sondas de bloqueo opcionales, detección de señales, detección (y medición de intensidad o conteo de sitios) mediante citometría de flujo o microscopio, presencia de la célula en suspensión, inmovilizado en sustrato o en un tejido, y/o similares. Además, las características adicionales que se describen en la presente, por ejemplo, en la sección titulada «Implementación, aplicaciones y ventajas» se pueden aplicar a los métodos, según sea pertinente.

35 Los métodos de la invención se pueden usar para el análisis de expresión génica en células individuales. Actualmente, el análisis de expresión génica trata con poblaciones celulares heterogéneas, tales como muestras de sangre o tumor. La sangre contiene varios subtipos de leucocitos, y cuando se miden los cambios en la expresión génica de la sangre entera o el ARN aislado de la sangre, no se sabe qué subtipo de células sanguíneas realmente cambió su expresión génica. Es posible que la expresión génica solamente de un subtipo determinado de células sanguíneas se vea afectada en un estado de enfermedad o mediante tratamiento con fármaco, por ejemplo. Por lo tanto, es deseable la tecnología que pueda medir la expresión génica en células individuales, para poder examinar los cambios en la expresión génica en células individuales. De manera similar, una muestra de tumor contiene una población celular heterogénea que incluye células tumorales, células normales, células estromales, células inmunitarias, etc. La tecnología actual analiza la suma de la expresión de todas estas células a través de lisado celular o ARN total. Sin embargo, puede que el cambio en la expresión total no sea representativo del cambio en las células tumorales diana. Nuevamente, sería útil analizar los cambios en la expresión en células individuales para poder examinar las células tumorales diana de manera específica, para ver cómo cambian las células diana en la expresión génica y cómo responden al tratamiento con fármaco, por ejemplo.

50 En un aspecto, la presente invención se puede usar para el análisis de expresión génica en células individuales. El análisis de expresión génica de células individuales se puede lograr al medir la expresión de un gen diana y normalizarlo con respecto a la expresión de un gen constitutivo, como se describió anteriormente. Simplemente como algunos ejemplos, la expresión normalizada en un estado de enfermedad se puede comparar con aquella en el estado normal, o la expresión en un estado tratado con fármaco se puede comparar con aquella en el estado normal. El cambio del nivel de expresión en células individuales puede tener una importancia biológica, lo que indica el avance de la enfermedad, eficacia y/o toxicidad terapéutica del fármaco, clasificación tumoral, etc.

60 Por consiguiente, también se describen en la presente los métodos para realizar el análisis de expresión génica comparativo en células individuales. En los métodos, se proporciona una primera población celular mixta que comprende una o más células de un tipo determinado. También se proporciona una segunda población celular mixta que comprende una o más células del tipo determinado. Se mide un nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos diana con respecto a un ácido nucleico de referencia en las células del tipo determinado de la primera población, para proporcionar un primer perfil de expresión. Se mide un nivel de expresión de uno o más ácidos

nucleicos diana con respecto a un ácido nucleico de referencia en las células del tipo determinado de la segunda población, para proporcionar un segundo perfil de expresión. Se comparan el primer y segundo perfil de expresión.

5 Por ejemplo, uno o más ácido nucleico diana son uno o más ARNm, por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, etc. ARNm. El nivel de expresión de cada ARNm se puede determinar con respecto al de un gen constitutivo cuyo ARNm sirve como ácido nucleico de referencia.

10 La primera y/o segunda población celular mixta contiene al menos otro tipo de célula además del tipo determinado, más comúnmente al menos dos o más de otros tipos de células, y opcionalmente varios a muchos de otros tipos de células (por ejemplo, como se encuentra en sangre entera, tumor u otra muestra biológica compleja). La relación de células del tipo determinado a células de todos los otros tipos en la primera o segunda población celular mixta es opcionalmente inferior a 1:1x10⁴, inferior a 1:1x10⁵, inferior a 1:1x10⁶, inferior a 1:1x10⁷, inferior a 1:1x10⁸ o incluso inferior a 1:1x10⁹.

15 Como será evidente, un cambio en el perfil de expresión génica entre las dos poblaciones puede indicar un estado de enfermedad o un avance, una respuesta al fármaco, una eficacia terapéutica, etc. Por lo tanto, por ejemplo, la primera población celular mixta puede ser de un paciente que ha sido diagnosticado o que será diagnosticado con una enfermedad o trastorno particular, mientras que la segunda población celular mixta es de un individuo sano. De manera similar, las primeras y segundas poblaciones mixtas pueden ser de un único individuo pero se toman en distintos puntos temporales, por ejemplo, para seguir el avance de la enfermedad o para evaluar la respuesta al tratamiento con fármaco. Por consiguiente, la primera población celular mixta puede tomarse de un individuo (por ejemplo, un humano) antes del inicio del tratamiento con un fármaco u otro compuesto, mientras que la segunda población se toma en un momento determinado después del inicio del tratamiento. Como otro ejemplo, la primera población mixta puede ser de un individuo tratado, mientras que la segunda población mixta es de un individuo no tratado.

25 Básicamente todas las características mencionadas de los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto al tipo de ácidos nucleicos diana y de referencia, tipo celular, origen de la muestra, fijación y permeabilización de la célula, lavado de la célula, desnaturalización de diana de cadena doble y ácidos nucleicos de referencia, tipo de etiquetas, uso y configuración de sondas de etiqueta, sondas de captura, preamplificadores y/o amplificadores, uso de sondas de bloqueo opcionales, detección de señales, detección (y medición de intensidad o conteo de sitios) mediante citometría de flujo o microscopio, presencia de la célula en suspensión, inmovilizado en sustrato o en un tejido, y/o similares. En la presente se describen ejemplos de ácidos nucleicos diana y de referencia.

30 En otro aspecto, los métodos se pueden usar para comparar la cantidad de copias en células individuales de una primera población (por ejemplo, células tumorales) con la cantidad de copias en células individuales de una segunda población (por ejemplo, células normales usadas como referencia). Las dianas de ácido nucleico pueden ser transcripciones o ADN genómico donde, por ejemplo, el grado de amplificación o eliminación de genes, tal como her-2, pueden correlacionarse con el avance del tumor. En otro aspecto, los métodos se pueden aplicar al análisis de expresión génica en células individuales incluso en una única población, que incluye, por ejemplo, células del mismo tipo pero en distintas etapas del ciclo celular.

Densidad de etiqueta

40 Los métodos de la invención permiten muchas más etiquetas que se captarán en pequeñas regiones de ácidos nucleicos diana que las técnicas que existen actualmente. Por ejemplo, las técnicas FISH estándar usan comúnmente sondas que abarcan 20 kb o más, y una sonda tiene comúnmente fluoróforos que se conjugan químicamente a una densidad de aproximadamente una molécula fluorescente cada siete nucleótidos de la sonda. Cuando se emplea la detección de diana de baliza molecular, se capta un par de etiquetas en la diana en la región cubierta por la baliza, comúnmente de aproximadamente 40 nucleótidos. Para una descripción adicional de ejemplos de técnicas actuales, ver, por ejemplo, publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. 2004/0091880 y 2005/0181463, USPN 6,645,731, y publicaciones de patente internacionales WO 95/09245 y 03/019141.

50 Los métodos que se describen en la presente, en comparación, permiten fácilmente la captura de cientos de etiquetas (por ejemplo, 400 o más) en la región de la diana cubierta por una única sonda de captura, por ejemplo, 20-25 nucleótidos o más. El grado teórico de amplificación que se logra a partir de una única sonda de captura se calcula fácilmente para cualquier configuración determinada de sondas de captura, amplificadores, etc., por ejemplo, el grado teórico de amplificación que se logra a partir de una única sonda de captura y, por lo tanto, la cantidad de etiquetas por longitud en nucleótidos de la sonda de captura, puede ser igual a la cantidad de preamplificadores unidos a la sonda de captura por la cantidad de amplificadores que se unen a cada preamplificador por la cantidad de sondas de etiqueta que se unen a cada preamplificador por la cantidad de etiquetas por sonda de etiqueta.

55 Por lo tanto, en un aspecto, la descripción proporciona métodos que facilitan la asociación de una densidad elevada de etiquetas con ácidos nucleicos diana en las células. Una clase general de realizaciones proporciona métodos de detección de dos o más dianas de ácido nucleico en una célula individual. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula comprende, o se sospecha que comprende, una primera diana de ácido

nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. En la célula, se capta una primera etiqueta con la primera diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula) y se capta una segunda etiqueta con la segunda diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula). Una primera señal de la primera etiqueta no puede distinguirse de una segunda señal de la segunda etiqueta. Como se mencionó, las etiquetas se captan a densidad elevada. Por lo tanto, un promedio de al menos una copia de la primera etiqueta por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico se capta con la primera diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y un promedio de al menos una copia de la segunda etiqueta por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico se capta con la segunda diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico. Se detectan la primera señal de la primera etiqueta y la segunda señal de la segunda etiqueta.

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

Básicamente todas las características mencionadas de los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente, por ejemplo, con respecto al tipo de etiquetas, detección de señales, tipo, tratamiento y suspensión de la célula, y/o similares. Las regiones de las primeras y segundas dianas de ácido nucleico abarcan opcionalmente al menos 25, 50, 100, 200 o más nucleótidos contiguos y/o como máximo 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 o menos nucleótidos. Una densidad similar de terceras, cuartas, quintas, sextas, etc. etiquetas está opcionalmente presente para (por ejemplo, captada en) terceras, cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico.

Si la diana es corta, FISH convencional (u otros métodos in situ de etiquetado directo) no puede obtener suficiente señal para lograr la detección de la diana. Sin embargo, los métodos descritos en la presente permiten, in situ, la detección de sensibilidad elevada de incluso dianas cortas (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico corta o una región corta de secuencia de polinucleótidos dentro de una molécula de ácido nucleico más larga), que incluye, por ejemplo, secciones diana de secuencias más largas y moléculas diana de menos de 1 kb. Por consiguiente, una clase general de realizaciones proporciona métodos de detección de una o más dianas de ácido nucleico en una célula individual que incluyen: proporcionar una muestra que comprende la célula, la cual comprende o se sospecha que comprende una primera diana de ácido nucleico; proporcionar una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta; proporcionar un conjunto de una o más primeras sondas de captura; hibridar, en la célula, las primeras sondas de captura con la primera diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, en donde el conjunto de primeras sondas de captura se hibrida con una región de la primera diana de ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, la molécula diana total o una parte de esta) que es de 1000 nucleótidos o menos de longitud (por ejemplo, 500 nucleótidos o menos de longitud); captar la primera sonda de etiqueta en las primeras sondas de captura, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; y detectar una primera señal de la primera etiqueta. Por ejemplo, el conjunto de primeras sondas de captura se puede hibridar con una región de la primera diana de ácido nucleico que tiene 200 nucleótidos o menos de longitud, 100 nucleótidos o menos de longitud, 50 nucleótidos o menos de longitud, o incluso 25 nucleótidos o menos de longitud, lo que permite la detección de ácidos nucleicos diana tan pequeños como microARN, por ejemplo. Otros ejemplos de diana incluyen, pero no se limitan a regiones cortas de ADN, ADN cromosómicos, ARN, ARNm y ARN ribosómicos.

Como para las realizaciones anteriores, los métodos son útiles para la detección multiplex de ácidos nucleicos, que incluyen la detección simultánea de dos o más dianas de ácido nucleico (por ejemplo, dianas cortas, o una combinación de dianas cortas y más largas). Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende una segunda diana de ácido nucleico, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una segunda señal de la segunda etiqueta se puede distinguir de la primera señal, proporcionar un conjunto de una o más segundas sondas de captura, hibridar en la célula las segundas sondas de captura con la segunda diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, captar la segunda sonda de etiqueta en las segundas sondas de captura y detectar la segunda señal a partir de la segunda etiqueta. De manera similar, se detectan simultáneamente en la célula las terceras, cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico, si se desea. preferiblemente, se logra cada etapa de hibridación o captura para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo.

Básicamente todas las características mencionadas de los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto al tipo de dianas de ácido nucleico, cantidad de copias, tipo celular, origen de la muestra, fijación y permeabilización de la célula, lavado de la célula, desnaturalización de ácidos nucleicos de cadena doble, tipo de etiquetas, uso y configuración de sondas de etiqueta, sondas de captura,

preamplificadores y/o amplificadores (que incluyen, por ejemplo, hibridación de dos sondas de captura con una única sonda de etiqueta, preamplificador o molécula de amplificador), uso de sondas de bloqueo opcionales, detección de señales, detección (y medición de intensidad) de señales de la célula individual mediante citometría de flujo o microscopio, presencia de la célula en suspensión, inmovilizado en sustrato o en un tejido, y/o similares.

5 Detección de células diana

Como se describió anteriormente, las células se pueden detectar e identificar mediante la detección de sus ácidos nucleicos constituyentes. En una clase general de realizaciones, se usan múltiples dianas con etiquetas no distinguibles para la identificación de un tipo celular específico. La única configuración del conjunto de sondas descrita anteriormente en la presente invención mejora significativamente la sensibilidad y especificidad de la detección de la diana de ácido nucleico que, a su vez, potenciaría la sensibilidad y especificidad en la identificación de células específicas de una población celular mixta.

Una aplicación particular de etiquetas no distinguibles para la detección e identificación de células diana específicas en una población celular mixta es para la detección, identificación y enumeración de CTC. La investigación muestra que existen distintos tipos de CTC, algunos de ellos tipo epiteliales, algunos experimentaron transición del epitelio a la mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés). Hemos descrito anteriormente el enfoque para el uso de un marcador «pan-CK» que comprende ARNm CK8, CK18, CK19 y otros ARNm CK para detectar las CTC tipo epiteliales. El conjunto de sondas para el marcador pan-CK es una agrupación de conjuntos de sondas con etiquetas no distinguibles, cada una se dirige específicamente a una de las CK en el grupo. Sin embargo, otros tipos de CTC, tales como CTC EMT que tienen un fenotipo molecular diferente no pueden expresar estos marcadores. Dado que las CTC son tan raras, es importante detectar y enumerar todas las CTC en la muestra. Por lo tanto, hemos expandido el marcador «pan-CK» en un marcador «pan-CTC», que comprende CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Muc1, EGFR, Twist, N-Cadherina y Fibronectina. Hemos llevado a cabo experimentos para demostrar que cada miembro en el grupo se expresa específicamente en determinados tipos de CTC, pero no en las células sanguíneas. Nuevamente, el conjunto de sondas de este grupo marcador pan-CTC es un conjunto de sondas con etiquetas no distinguibles, en donde cada sonda se dirige específicamente a un miembro del grupo. Por lo tanto, tanto las CTC tipo epiteliales como las CTC EMT se pueden detectar y reconocer en una muestra, si están presentes.

Como se describe en la presente, se usan dos o más dianas de ácido nucleico para la identificación de un tipo celular específico; cada diana es un marcador independiente que produce señales distinguibles. En aun otra clase general de realizaciones, se usan dos o más grupos de dianas para la identificación de un tipo celular específico; cada grupo es un marcador independiente para que cada miembro diana del mismo grupo se etiquete para generar señales no distinguibles y un grupo diferente se etiqueta para producir diferentes señales distinguibles. Para determinadas aplicaciones, por ejemplo, la detección de células raras a partir de mezclas de células heterogéneas grandes, dicho esquema para detectar múltiples marcadores redundantes es ventajoso. El siguiente ejemplo hipotético ilustra una ventaja de la detección de marcadores redundantes.

Supongamos que las células tumorales en circulación (CTC) deban detectarse a partir de una muestra de sangre en la cual la concentración de CTC es uno en 106 glóbulos blancos normales. Si un único marcador para las CTC (por ejemplo, un ácido nucleico cuya presencia o cantidad de copias puede distinguir de forma exclusiva y suficiente la célula del resto de la población celular) presenta una especificidad de detección de 1 en 103, 1000 células se identificarán erróneamente como «CTC» cuando se contabilizan 106 células. (Dichos falsos positivos pueden generarse a partir de señales de fondo aleatorias generadas mediante la unión no específica de una o más sondas pertinentes o de factores similares.) Si se incluye un marcador independiente adicional que, por sí mismo, también tiene una especificidad de detección de 1 en 103, y si se identifica una célula como una CTC solamente si son positivos ambos marcadores, la especificidad de detección combinada ahora aumenta drásticamente en teoría, hasta 1 en $103 \times 103 = 106$. Esta especificidad es suficiente para la detección de CTC directa en glóbulos blancos normales según estas suposiciones. De manera similar, si se usan tres marcadores redundantes independientes para la identificación de CTC, la especificidad de detección puede aumentar hasta 1 en 109. Por lo tanto, el uso de dos o más marcadores redundantes reduce la cantidad de falsos positivos y facilita la detección de incluso células raras a partir de muestras complejas.

Por consiguiente, una clase general de aspectos describe métodos de detección de una célula individual de un tipo determinado. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende una mezcla de tipos celulares que incluyen al menos una célula del tipo determinado. Se proporcionan una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una primera señal de la primera etiqueta se puede distinguir de una segunda señal de la segunda etiqueta. En la célula, la primera sonda de etiqueta se capta en una primera diana de ácido nucleico (cuando la primera diana de ácido nucleico está presente en la célula) y la segunda sonda de etiqueta se capta en la segunda diana de ácido nucleico (cuando la segunda diana de ácido nucleico está presente en la célula). La primera señal de la primera etiqueta y la segunda señal de la segunda etiqueta se detectan y correlacionan con la presencia, ausencia o cantidad de primeras y segundas dianas de ácido nucleico correspondientes en la célula. La célula se identifica como del tipo determinado en función de la detección de la presencia, ausencia o cantidad (por ejemplo, una cantidad distinta de cero) de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos dentro de la célula, en donde el tipo determinado de

célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla según la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico y la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula (es decir, las dianas de ácido nucleico son marcadores redundantes del tipo celular determinado). Una intensidad de la primera señal y una intensidad de la segunda señal se miden opcionalmente y se correlacionan con una cantidad del ácido nucleico correspondiente presente en la célula. Como otro ejemplo, es posible contabilizar un sitio de señal para cada copia de las primeras y segundas dianas de ácido nucleico para cuantificarlo, como se describe de manera más detallada más adelante.

Cada diana de ácido nucleico que sirve como marcador del tipo celular determinado puede distinguir el tipo celular según su presencia en la célula, según su cantidad (cantidad de copias, por ejemplo, su cantidad de copias genómicas o su nivel de expresión de transcripción) o según su ausencia en la célula (un marcador negativo). Un conjunto de dianas de ácido nucleico puede incluir distintos tipos de dichos marcadores; es decir, una diana de ácido nucleico puede servir como marcador positivo, distinguiendo la célula según su presencia o cantidad distinta de cero en la célula, mientras que otra sirve como marcador negativo, distinguiendo la célula según su ausencia en la célula. Por ejemplo, la célula comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico, y se identifica la célula como del tipo determinado en función de la detección de la presencia o cantidad de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos dentro de la célula, en donde el tipo determinado de célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla según la presencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico o la presencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.

Las sondas de etiqueta se pueden unir directamente a las dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera sonda de etiqueta se puede hibridar con la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda sonda de etiqueta se puede hibridar con la segunda diana de ácido nucleico. De manera alternativa, algunas o todas las sondas de etiqueta pueden unirse indirectamente a sus dianas de ácido nucleico, por ejemplo, a través de sondas de captura. Por ejemplo, las primeras y segundas sondas de etiqueta pueden unirse directamente a las dianas de ácido nucleico, o una puede unirse directamente mientras que la otra se une indirectamente, o ambas pueden unirse indirectamente.

Las sondas de etiqueta se captan opcionalmente en las dianas de ácido nucleico mediante sondas de captura. En una clase de realizaciones, se proporcionan al menos una primera sonda de captura y al menos una segunda sonda de captura. En la célula, la primera sonda de captura se hibrida con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda de captura se hibrida con la segunda diana de ácido nucleico. La primera sonda de etiqueta se captura con la primera sonda de captura y la segunda sonda de etiqueta se captura con la segunda sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta con la primera diana de ácido nucleico y la segunda sonda de etiqueta con la segunda diana de ácido nucleico. Las características descritas para los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, con respecto a la configuración y la cantidad de las sondas de etiqueta y captura, uso opcional de preamplificadores y/o amplificadores, amplificación por círculo rodante de polinucleótidos circulares, y similares.

Se detectan opcionalmente en la célula las terceras, cuartas, quintas, etc. dianas de ácido nucleico. Por ejemplo, el método incluye opcionalmente: proporcionar una tercera sonda de etiqueta que comprende una tercera etiqueta, en donde una tercera señal de la tercera etiqueta se puede distinguir de las primeras y segundas señales, captar en la célula la tercera sonda de etiqueta en una tercera diana de ácido nucleico (cuando está presente en la célula), y detectar la tercera señal a partir de la tercera etiqueta. Las terceras, cuartas, quintas, etc. sondas de etiqueta se hibridan opcionalmente de manera directa con su ácido nucleico correspondiente, o se pueden captar indirectamente mediante sondas de captura como se describe para las primeras y segundas sondas de etiqueta.

Se pueden usar marcadores adicionales en cualquiera de una variedad de maneras. Por ejemplo, la célula puede comprender la tercera diana de ácido nucleico, y la primera y/o segunda señal se puede normalizar con la tercera señal. Los métodos pueden incluir la identificación de la célula como del tipo determinado en función de la primera y/o segunda señal normalizada, por ejemplo, en realizaciones en las que el tipo celular diana se puede distinguir de los otros tipos celulares en la mezcla en función de la cantidad de copias de las primeras y/o segundas dianas de ácido nucleico, en lugar de simplemente según su presencia en el tipo celular diana y no en los otros tipos celulares. Ejemplos incluyen células detectables basadas en un patrón de expresión génica diferencial, CTC u otras células tumorales detectables mediante la sobreexpresión de uno o más ARNm específicos, y CTC u otras células tumorales detectables mediante amplificación o eliminación de una o más regiones cromosómicas específicas.

Como otro ejemplo, la tercera diana de ácido nucleico puede servir como un tercer marcador redundante para el tipo celular diana, por ejemplo, para mejorar la especificidad del ensayo para el tipo celular deseado. Por lo tanto, los métodos pueden incluir correlacionar la tercera señal detectada a partir de la célula con la presencia, ausencia o cantidad de la tercera diana de ácido nucleico en la célula, e identificar la célula como del tipo determinado en función de la detección de la presencia, ausencia o cantidad de las primeras, segundas y terceras dianas de ácidos nucleicos dentro de la célula, en donde el tipo determinado de célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla según la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico, la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico, o la presencia, ausencia o cantidad de la tercera diana de ácido nucleico en la célula.

Como otro ejemplo, los marcadores adicionales pueden ayudar a identificar el tipo celular. Por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de los primeros y terceros marcadores puede ser suficiente para identificar el tipo celular, así

5 como la presencia, ausencia o cantidad de los segundos y cuartos marcadores; los cuatro marcadores podrían detectarse para proporcionar dos conjuntos redundantes de marcadores y, por lo tanto, mayor especificidad de detección. Como otro ejemplo, se pueden usar uno o más marcadores adicionales en selección negativa contra tipos celulares no deseados; por ejemplo, la identidad de una célula como CTC se puede corroborar mediante la ausencia de la célula de uno o más marcadores presentes en células sanguíneas y no en células tumorales en circulación.

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

10 Las señales de las dianas adicionales se normalizan opcionalmente con un ácido nucleico de referencia como se describió anteriormente. La potencia de la señal se ajusta opcionalmente entre las dianas dependiendo de sus cantidades de copias esperadas, si se desea. Las señales de los ácidos nucleicos diana en la célula se comparan opcionalmente con aquellas de una célula de referencia, como se indicó anteriormente.

15 Una diana de ácido nucleico puede ser básicamente cualquier ácido nucleico que se detecta de manera deseada en la célula. Por ejemplo, una diana de ácido nucleico puede ser un ADN, un ADN cromosómico, un ARN, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico o similar. La diana de ácido nucleico puede ser un ácido nucleico endógeno de la célula. Como otro ejemplo, la diana puede ser un ácido nucleico que se introduce o expresa en la célula mediante infección de la célula con un patógeno, por ejemplo, un ARN o ADN genómico viral o bacteriano, un plásmido, un ARNm viral o bacteriano, o similar.

20 Las primeras y segundas (y/o terceras, cuartas, etc. Opcionales) dianas de ácido nucleico pueden formar parte de una única molécula de ácido nucleico, o pueden ser moléculas individuales. Se describen varias ventajas y aplicaciones de ambos enfoques de manera más detallada más adelante, por ejemplo, en la sección titulada «Implementación, aplicaciones y ventajas». En una clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm. De manera alternativa, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera región de un ARNm y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda región del mismo ARNm. En otra clase de realizaciones, la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico. Las primeras y segundas secuencias de polinucleótidos de ADN cromosómico se ubican opcionalmente en el mismo cromosoma, por ejemplo, dentro del mismo gen, o en distintos cromosomas.

Los métodos se pueden aplicar a la detección e identificación de tipos de células raras. Por ejemplo, la relación de células del tipo determinado a células de todos los otros tipos en la mezcla es opcionalmente inferior a 1:1x10⁴, inferior a 1:1x10⁵, inferior a 1:1x10⁶, inferior a 1:1x10⁷, inferior a 1:1x10⁸ o incluso inferior a 1:1x10⁹.

35 Básicamente cualquier tipo de célula que se puede diferenciar en función de los marcadores adecuados (o regiones redundantes de un único marcador, por ejemplo, un único ARNm o región cromosómica amplificada/eliminada) se puede detectar e identificar usando los métodos. Como algunos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral en circulación u otra célula tumoral, una célula infectada por virus, una célula fetal en la sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (por ejemplo, sangre u otro fluido corporal), una célula endotelial, una célula endotelial precursora o una célula del miocardio en sangre, una célula madre o un linfocito T. Los tipos de células raras pueden enriquecerse antes de realizar los métodos, si fuera necesario, mediante los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, lisis de glóbulos rojos, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, etc.).

45 Básicamente todas las características mencionadas de los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto al origen de la muestra, fijación y permeabilización de la célula, lavado de la célula, desnaturalización de ácidos nucleicos de cadena doble, tipo de etiquetas, uso de sondas de bloqueo opcionales, detección de señales, detección (y medición de intensidad o conteo de sitios) de señales de la célula individual mediante citometría de flujo o microscopio, presencia de la célula en suspensión, inmovilizado en sustrato o en un tejido, y/o similares. Además, las características adicionales que se describen en la presente, por ejemplo, en la sección titulada «Implementación, aplicaciones y ventajas» se pueden aplicar a los métodos, según sea pertinente.

En otro aspecto, la detección de células individuales de un tipo determinado se realiza como se describió anteriormente, pero las primeras y segundas dianas de ácido nucleico no necesitan ser marcadores redundantes para dicho tipo celular. Las dianas de ácido nucleico pueden ser básicamente cualquier ácido nucleico deseado, que incluye, por ejemplo, marcadores redundantes y/o no redundantes del tipo celular.

55 Detección de ácidos nucleicos en células en suspensión

Otro aspecto de la invención proporciona métodos de detección de ácidos nucleicos en células en suspensión, por ejemplo, detección rápida mediante citometría de flujo. Por consiguiente, en la presente se describen métodos de detección de una o más dianas de ácido nucleico en una célula individual que incluyen: proporcionar una muestra

que comprende la célula, la cual comprende o se sospecha que comprende una primera diana de ácido nucleico; proporcionar una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta; proporcionar al menos una primera sonda de captura; hibridar, en la célula, la primera sonda de captura en la primera diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula; captar la primera sonda de etiqueta en la primera sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; y detectar, mientras la célula está en suspensión, una primera señal a partir de la primera etiqueta. Por ejemplo, la señal se puede detectar convenientemente al realizar citometría de flujo.

Los métodos son útiles para la detección multiplex de ácidos nucleicos, que incluye la detección simultánea de dos o más dianas de ácido nucleico. Por lo tanto, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende una segunda diana de ácido nucleico, y los métodos incluyen opcionalmente: proporcionar una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una segunda señal de la segunda etiqueta se puede distinguir de la primera señal, proporcionar al menos una segunda sonda de captura, hibridar en la célula la segunda sonda de captura con la segunda diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, captar la segunda sonda de etiqueta en la segunda sonda de captura y detectar la segunda señal a partir de la segunda etiqueta. De manera similar, se detectan simultáneamente en la célula las terceras, cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico, si se desea. preferiblemente, se logra cada etapa de hibridación o captura para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo.

Los métodos permiten la detección de incluso dianas de cantidad baja o de una sola copia. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, aproximadamente 1000 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico están presentes en la célula (por ejemplo, aproximadamente 100 copias o menos, aproximadamente 50 copias o menos, aproximadamente 10 copias o menos, aproximadamente 5 copias o menos, o incluso una única copia).

Básicamente todas las características mencionadas de los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto al tipo de dianas de ácido nucleico, tipo celular, origen de la muestra, fijación y permeabilización de la célula, lavado de la célula, desnaturalización de ácidos nucleicos de cadena doble, tipo de etiquetas, uso y configuración de sondas de etiqueta, sondas de captura, preamplificadores y/o amplificadores (que incluyen, por ejemplo, hibridación de dos sondas de captura con una única sonda de etiqueta, preamplificador o molécula de amplificador), uso de sondas de bloqueo opcionales, detección de señales, detección (y medición de intensidad) de señales de la célula individual mediante citometría de flujo o microscopio, presencia de la célula en suspensión o inmovilizada en un sustrato, y/o similares.

30 Cuantificación de ARNm en células individuales mediante imagenología y conteo de sitios

En los ensayos FISH de ADN existentes, la cantidad de copias de una secuencia de ADN diana se visualizan y contabilizan generalmente a «un sitio por locus» ya sea manualmente o usando software de procesamiento de imágenes. Sin embargo, ha sido difícil emplear el mismo enfoque para cuantificar la cantidad de copias de transcripciones de ARNm en células individuales dado que el ARNm, generalmente de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, es mucho más corto que la longitud de las sondas necesarias para detectar el ADN (100.000 nucleótidos). Esto conlleva la dificultad en la visualización de moléculas de ARN simple. La mayoría de las metodologías de etiquetado existentes no pueden unir moléculas de etiqueta fluorescentes suficientes sobre un ARNm para generar intensidad de señal suficiente para visualizar una molécula de ARN simple. Determinados aspectos de la solicitud que se describe en la presente, sin embargo, emplean un sistema de conjuntos de sondas que comprende preamplificadores y amplificadores, que aumenta significativamente la cantidad de moléculas de etiqueta que se pueden unir a una molécula de ARN simple y permite que se observe usando un microscopio normal. Dado que una molécula de ARN es de un tamaño tan pequeño, produce un sitio limitado por difracción, que es afilado y bien redondeado y se puede distinguir de sitios de fondo según sus características espaciales de aplicación exclusivas. Además, algunos aspectos de la solicitud emplean un diseño de sonda de captura de «hibridación cooperativa» que reduce de manera eficaz el ruido de fondo provocado por hibridación no específica. La combinación de estos dos factores significa que cada copia de un ARN puede observarse en un microscopio normal como un sitio brillante afilado claramente distinguible del fondo circundante. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 más adelante en la presente). Esto permite la cuantificación verdaderamente fiable de la cantidad de copias de ARN, de ARN incluso endógenos, según conteo de sitios ya sea manual o automáticamente usando software de procesamiento de imágenes simple. Dado que las sondas de captura se pueden diseñar contra básicamente cualquier ARN, se pueden cuantificar incluso los ARN endógenos, sin la necesidad de crear construcciones informantes recombinantes que incluyen sitios de unión de sondas repetitivos. Para aplicaciones de diagnóstico, en particular, dado que la mayoría de los genes humanos expresan menos de 50 copias de su ARN por célula, el conteo de sitios es una herramienta eficaz y útil para la cuantificación del nivel de expresión génica. Si bien las técnicas son particularmente útiles para cuantificar el ARN in situ, como se describe de manera más detallada más adelante, también se pueden aplicar a ARN que no se encuentra dentro de ninguna célula.

En la presente se describen métodos de cuantificación de un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ARN). En los métodos, se proporciona una muestra que comprende una o más copias del ácido nucleico diana. Comúnmente, el ácido nucleico diana es endógeno de una célula. Se captan múltiples copias de una etiqueta ópticamente detectable en cada una de una o más copias del ácido nucleico diana (por ejemplo, una etiqueta fluorescente o una enzima que es ópticamente detectable, por ejemplo, con un sustrato fast red). Las copias de la etiqueta son ópticamente

detectables. Se observa un foco de señal óptico (o, de manera equivalente, punto o sitio) para cada una de una o más copias del ácido nucleico diana, y se contabilizan uno o más focos resultantes, mediante lo cual se contabiliza el ácido nucleico diana.

5 Como se mencionó, el ácido nucleico diana puede ser un ARN, por ejemplo, un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico, o similar. Los métodos se pueden aplicar, por ejemplo, a ARN in situ en una célula o sin células. Por lo tanto, en una clase de ejemplos, la muestra comprende un lisado celular u otra solución que comprende el ARN. En otra clase de ejemplos, la muestra comprende la célula de la cual el ARN diana es endógeno, y las etapas de captura, detección y conteo se realizan en la célula. Opcionalmente, el ARN se ubica en el citoplasma de la célula.

10 Los métodos son particularmente útiles para la cuantificación de ácidos nucleicos de baja abundancia (por ejemplo, ARN). Por lo tanto, en una realización, aproximadamente 100 copias o menos del ácido nucleico diana están presentes en la célula, lisado celular, etc., por ejemplo, aproximadamente 10 copias o menos, aproximadamente 5 copias o menos o incluso una única copia. Como se mencionó, se capta una gran cantidad de etiquetas en cada molécula. Por ejemplo, se pueden captar al menos aproximadamente 400 copias de la etiqueta en cada una de una o más copias del ácido nucleico diana, por ejemplo, al menos aproximadamente 1000 copias, al menos aproximadamente 2000 copias, al menos aproximadamente 4000 copias o al menos aproximadamente 8000 copias. La etiqueta puede ser, por ejemplo, una etiqueta fluorescente o una enzima (por ejemplo, una enzima detectable por medios ópticos usando un sustrato fluorogénico o cromogénico, por ejemplo, fast red).

20 La etiqueta puede captarse en el ácido nucleico de forma directa o indirecta. Opcionalmente, la etiqueta se proporciona al proporcionar una o más copias de una sonda de etiqueta, la sonda de etiqueta comprende una o más copias de la etiqueta. La sonda de etiqueta se puede hibridar directamente con el ácido nucleico diana. preferiblemente, sin embargo, la sonda de etiqueta se capta indirectamente, por ejemplo, al proporcionar una o más sondas de captura, hibridar una copia de cada una de una o más sondas de captura con cada una de una o más copias del ácido nucleico diana, y captar una o más copias de la sonda de etiqueta en una o más sondas de captura. Como para los ejemplos anteriores, la sonda de etiqueta puede unirse directamente a la sonda de captura, o más comúnmente a un amplificador o un preamplificador y amplificador sirven como intermedios. Opcionalmente, dos o más sondas de captura se unen a cada sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador.

25 Básicamente todas las características mencionadas para los métodos anteriores aplican a estos ejemplos también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto al tipo celular, tipo de diana (que incluye el tamaño), origen de la muestra, fijación y permeabilización de la célula, lavado de la célula, desnaturalización de ácidos nucleicos de cadena doble, tipo de etiqueta, configuración de sondas de etiqueta, sondas de captura, preamplificadores y/o amplificadores, densidad de etiqueta, uso de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares.

30 Una clase general relacionada de ejemplos proporciona métodos de cuantificación de un ARN diana. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende una o más copias del ARN diana. El ARN diana es generalmente endógeno de una célula. (Es decir, el ARN es un ARN de origen natural, a diferencia de un ARN producido mediante intervención humana, por ejemplo, usando técnicas de ADN recombinante para insertar sitios de unión a la sonda en un ARN para generar un ARN informante con el fin de controlar su presencia, ubicación o cantidad en la célula). Se captan múltiples copias de una etiqueta fluorescente en cada una de una o más copias del ARN diana. Las copias de la etiqueta se exponen a luz de excitación (de una longitud de onda adecuada para la etiqueta), mediante lo cual las copias de la etiqueta fluorescen, lo que proporciona un foco fluorescente (o, de manera equivalente, punto o sitio) para cada una de una o más copias del ARN diana. Se contabilizan uno o más focos fluorescentes resultantes, cuantificando así el ARN diana. El ARN diana puede ser un ARNm, un microARN, un ARN ribosómico, un ARN nuclear, un ARN citoplásmico, o similar.

35 Los métodos se pueden aplicar, por ejemplo, a ARN in situ en una célula o sin células. Por lo tanto, en una clase de ejemplos, la muestra comprende un lisado celular u otra solución que comprende el ARN. El ARN se une opcionalmente a un soporte sólido, por ejemplo, antes o después de la captura de la etiqueta en el ARN. El ARN puede unirse directamente al soporte, o puede unirse a un resto que, a su vez, se une directa o indirectamente al soporte, por ejemplo, un oligonucleótido u oligonucleótidos; ver, por ejemplo, la sección titulada «Captura no específica» más adelante en la presente y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. 2006/0286583 y 2006/0263769. En otra clase de ejemplos, la muestra comprende la célula de la cual el ARN diana es endógeno, y las etapas de captura, exposición y conteo se realizan en la célula.

40 Los métodos son particularmente útiles para la cuantificación de ARN de baja abundancia. Por lo tanto, en un ejemplo, aproximadamente 100 copias o menos del ARN diana están presentes en la célula, lisado celular, etc., por ejemplo, aproximadamente 10 copias o menos, aproximadamente 5 copias o menos o incluso una única copia. Como se mencionó, se capta una gran cantidad de etiquetas en cada molécula. Por ejemplo, se pueden captar al menos aproximadamente 400 copias de la etiqueta en cada una de una o más copias del ARN diana, por ejemplo, al menos aproximadamente 1000 copias, al menos aproximadamente 2000 copias, al menos aproximadamente 4000 copias o al menos aproximadamente 8000 copias.

45 La etiqueta puede captarse en el ARN de forma directa o indirecta. Opcionalmente, la etiqueta se proporciona al proporcionar una o más copias de una sonda de etiqueta, la sonda de etiqueta comprende una o más copias de la

etiqueta. La sonda de etiqueta se puede hibridar directamente con el ARN diana. Preferiblemente, sin embargo, la sonda de etiqueta se capta indirectamente, por ejemplo, al proporcionar una o más sondas de captura, hibridar una copia de cada una de una o más sondas de captura con cada una de una o más copias del ARN diana, y captar una o más copias de la sonda de etiqueta en una o más sondas de captura. Como para los ejemplos anteriores, la sonda de etiqueta puede unirse directamente a la sonda de captura, o más comúnmente a un amplificador o un preamplificador y amplificador sirven como intermedios. Opcionalmente, dos o más sondas de captura se unen a cada sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador. El conteo de los focos puede ser manual (por ejemplo, implica la inspección visual a través de un microscopio) o se puede automatizar; ver, por ejemplo, Raj et. ál. (2006) "Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells" PLoS Biology 4(10) e309 1707-1719 y Vargas et ál. (2005) "Mechanism of RNA transport in the nucleus" Proc Natl Acad Sci 102:17008-17013.

Básicamente todas las características mencionadas para los métodos anteriores aplican a estos ejemplos también, según sea pertinente; por ejemplo, con respecto al tipo celular, tipo de diana (incluido el tamaño), origen de la muestra, fijación y permeabilización de la célula, lavado de la célula, desnaturalización de ácidos nucleicos de cadena doble, tipo de etiqueta, configuración de sondas de etiqueta, sondas de captura, preamplificadores y/o amplificadores, densidad de etiqueta, uso de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares.

Detección de corte y empalme de ácidos nucleicos en células individuales

En un aspecto, el corte y empalme de secuencias de ácido nucleico específicas se puede detectar usando la tecnología de la presente. En un ejemplo de realización ilustrado en la Figura 20 Panel A, las sondas de captura 2004 y 2005 se diseñan para hibridarse con una primera variante de corte y empalme. Las sondas de captura 2004 y 2005 son complementarias de las secuencias del ácido nucleico diana (la primera variante de corte y empalme) en cada lado de la unión de corte y empalme (secuencias 2001 y 2002, respectivamente, por ejemplo, un primer exón y un segundo exón). Si se ha formado el corte y empalme (como en la Figura 20 Panel A), las dos sondas de captura se alinean en paralelo en la hibridación, lo que proporciona suficiente potencia de hibridación en el ensayo para mantener la unión del preamplificador 2006, con el cual se hibridan múltiples amplificadores y sondas de etiqueta. (Será evidente que las sondas de captura en su lugar podrían hibridarse, por ejemplo, con un amplificador o sonda de etiqueta como se describe en otra parte de la presente). Luego, se genera la señal. Si no se forma el corte y empalme o se ha formado un corte y empalme distinto, las dos sondas de captura no se alinearán en paralelo y no habrá suficiente potencia de hibridación para mantener la unión del preamplificador (o amplificador o sonda de etiqueta) y no se generará ninguna señal. Ver La Figura 20 Panel B, que ilustra una segunda variante de corte y empalme que incluye las secuencias 2001 y 2003 (por ejemplo, el primer exón y un tercer exón). La sonda de captura 2004, pero no la sonda de captura 2005, puede hibridarse con la segunda variante de corte y empalme. La hibridación solamente de la sonda de captura 2004 es insuficiente para captar el preamplificador 2006 y, por lo tanto, el amplificador y la sonda de etiqueta, con la segunda variante de corte y empalme.

En otro ejemplo, distintas regiones de la variante de corte y empalme que se detectarán se etiquetan con distintas etiquetas. Este enfoque puede ser particularmente útil para la detección de una variante de corte y empalme específico, en donde la variante no incluye una secuencia única (por ejemplo, en donde otras variantes de corte y empalme del ARN incluyen los mismos exones pero en distintas combinaciones). En la realización que se muestra en la Figura 21, la variante de corte y empalme diana incluye las secuencias 2101 y 2102 (por ejemplo, dos exones presentes en la variante de corte y empalme diana pero no presentes de manera combinada en otras variantes de corte y empalme del ARNm) separadas por la secuencia 2103. Las sondas de captura 2104 captan el preamplificador 2106, con el cual se hibrida un primer amplificador y una primera sonda de etiqueta. Las sondas de captura 2105 captan el preamplificador 2107, con el cual se hibrida un segundo preamplificador y una segunda sonda de etiqueta. Las primeras y segundas etiquetas emiten distintas señales. Si se forma el corte y empalme, las señales generadas por las etiquetas correspondientes se ubicarán espacialmente en un único sitio, proporcionando un nuevo color; otras variantes que incluyen 2101 o 2102 pero no ambos se unirán solamente a una de las dos etiquetas, formando así distintos sitios de los dos colores originales.

En aun otro ejemplo, una de las sondas de captura puede ser complementaria a una región de la variante de corte y empalme diana que incluye la unión de corte y empalme, por ejemplo, para variantes en las cuales la secuencia en la unión de corte y empalme es única.

Será evidente que se puede aplicar cualquier ejemplo de configuración a detección singleplex o multiplex de variantes de corte y empalme.

Aplicaciones a análisis de «muestras enteras»

La presente invención se refiere a la detección in situ de ácidos nucleicos en células individuales. Sin embargo, muchas características descritas en la presente, que incluyen, pero no se limitan a diseño de conjuntos de sondas, multiplexación, detección y cuantificación, también se pueden usar en aplicaciones de detección de ácidos nucleicos de muestra entera. La presente sección describió varios ejemplos específicos de dichas aplicaciones que, sin embargo, no forman parte de la invención.

Captura no específica

En los ensayos basados en hibridación existentes, tales como ADN_r, solamente se captan las moléculas de ácido nucleico diana en un sustrato sólido, mientras que otros ácidos nucleicos se retiran por lavado. Dicha medida reduce el ruido de fondo y, por lo tanto, mejora la especificidad de detección. Sin embargo, las técnicas descritas en la presente facilitan la detección de un ácido nucleico diana (singleplex o multiplex), en donde básicamente todos los ácidos nucleicos en una muestra determinada se inmovilizan de manera no específica. Las sondas de captura específicas se diseñan para unir moléculas de etiqueta al ácido nucleico diana. Como resultado, solamente el ácido nucleico diana producirá la señal. Cualquier aumento posible del ruido de fondo debido a unión no específica de ácidos nucleicos puede compensarse con creces con el efecto de reducción de ruido del diseño de sonda, por ejemplo, un diseño Z doble u otro enfoque en el que se usan dos o más sondas de captura para captar un preamplificador, amplificador o sonda de etiqueta (ver, por ejemplo, la sección titulada «Selección y diseño de sondas» más adelante en la presente). Dicho esquema de diseño de conjuntos de sondas presenta la ventaja de reducir la complejidad del conjunto de sondas, simplificar la etapa de ensayo y reducir los costos.

En aplicaciones de detección in situ, los ácidos nucleicos se inmovilizan en las células a través de una etapa de fijación de células que emplea química de reticulación. En aplicaciones de detección de muestras enteras, las moléculas de ácido nucleico se liberan en solución a partir de células individuales. Se pueden inmovilizar en sustratos sólidos usando cualquiera de los métodos de inmovilización de ácido nucleico existentes, que incluyen, pero no se limitan a inmovilización en membranas de nitrocelulosa o perlas de sílice, unión de poli-T oligo con una superficie del sustrato, que, a su vez, capta la sección poli-A de moléculas de ARN en el sustrato, y unión de un ácido nucleico de secuencia aleatoria larga en una superficie del sustrato, que puede proporcionar afinidad por moléculas de ARN o ADN.

Quantificación del nivel de expresión génica a través de imagenología y conteo de sitios

En las tecnologías de detección de muestras enteras existentes, el nivel de expresión de un gen particular se cuantifica al medir la intensidad de la etiqueta unida al ácido nucleico diana. La sensibilidad de detección se limita al ruido de fondo, que se produce mediante unión no específica de moléculas de etiqueta o auto-fluorescencia. Cuando se aplican técnicas descritas en la presente a la detección de ácido nucleico de muestra entera, las células se lisan para liberar básicamente todas las moléculas de ácido nucleico celulares en una solución de muestra. Luego, las moléculas de ácido nucleico diana se pueden inmovilizar en sustrato sólido ya sea específica o no específicamente junto con otros ácidos nucleicos. Como se describe en las secciones anteriores, una gran cantidad de sondas de etiqueta se puede unir a una única molécula de ácido nucleico diana, que produce suficiente señal para cada molécula de ácido nucleico diana que se visualizará como sitio en un microscopio normal. El ruido producido por la unión de etiqueta no específica o auto-fluorescencia parece ser parches más grandes con menor intensidad, que son fácilmente distinguibles de la señal real. Como resultado, la cantidad de copias de uno o más ácidos nucleicos diana se puede cuantificar mediante conteo de sitios ya sea manualmente o usando software de procesamiento de imágenes simple. Esta metodología de cuantificación es especialmente útil cuando la cantidad total de moléculas diana en la muestra es muy pequeña y la precisión de detección necesaria es alta.

Detección de corte y empalme de ácidos nucleicos en solución de muestra entera

El corte y empalme de moléculas de ácido nucleico que genera una secuencia específica o no específica se puede detectar de manera similar a las que se describen para la detección en células individuales, salvo que las moléculas de ácido nucleico se liberan de las células en soluciones de muestra y comúnmente se inmovilizan en un sustrato antes de la detección.

Composiciones y kits

La solicitud también describe composiciones útiles en la práctica o producidas mediante los métodos. Un ejemplo de clase de ejemplos proporciona una composición que incluye una célula fija o permeabilizada, la cual comprende o se sospecha que comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico, al menos una primera sonda de captura capaz de hibridarse con la primera diana de ácido nucleico, al menos una segunda sonda de captura capaz de hibridarse con la segunda sonda de captura, una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta. Una primera señal de la primera etiqueta puede distinguirse de una segunda señal de la segunda etiqueta. La célula comprende opcionalmente las primeras y segundas sondas de captura y sondas de etiqueta. Las primeras y segundas sondas de captura se hibridan opcionalmente con sus dianas de ácido nucleico respectivas en la célula.

Las características descritas para los métodos anteriores para la captura indirecta de las sondas de etiqueta en las dianas de ácido nucleico aplican a estos ejemplos también. Por ejemplo, las sondas de etiqueta se pueden hibridar con las sondas de captura. En una clase de ejemplos, la composición incluye una primera sonda de captura única y una segunda sonda de captura única, en donde la primera sonda de etiqueta es capaz de hibridarse con la primera sonda de captura y la segunda sonda de etiqueta es capaz de hibridarse con la segunda sonda de captura. En otra clase de ejemplos, la composición incluye dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta. Una única primera sonda de etiqueta es capaz de hibridarse con cada una de las primeras sondas de captura, y una única segunda sonda de etiqueta es capaz de hibridarse con cada una de las segundas sondas de captura.

En otro aspecto, se pueden emplear amplificadores para aumentar la cantidad de sondas de etiqueta captadas en cada diana. Por ejemplo, en una clase de ejemplos, la composición incluye una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta y múltiples segundas sondas de etiqueta, un primer amplificador y un segundo amplificador. El primer amplificador es capaz de hibridarse con la primera sonda de captura y con múltiples primeras sondas de etiqueta, y el segundo amplificador es capaz de hibridarse con la segunda sonda de captura y con múltiples segundas sondas de etiqueta. En otra clase de ejemplos, la composición incluye dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta, múltiples segundas sondas de etiqueta, un primer amplificador y un segundo amplificador. El primer amplificador es capaz de hibridarse con una de las primeras sondas de captura y con múltiples primeras sondas de etiqueta, y el segundo amplificador es capaz de hibridarse con una de las segundas sondas de captura y con múltiples segundas sondas de etiqueta.

En otro aspecto, se emplean preamplificadores y amplificadores para captar las sondas de etiqueta en las dianas. En una clase de ejemplos, la composición incluye una única primera sonda de captura, una única segunda sonda de captura, múltiples primeras sondas de etiqueta, múltiples segundas sondas de etiqueta, múltiples primeros amplificadores, múltiples segundos amplificadores, un primer preamplificador y un segundo preamplificador. El primer preamplificador es capaz de hibridarse con la primera sonda de captura y con los múltiples primeros amplificadores, y el segundo preamplificador es capaz de hibridarse con la segunda sonda de captura y con los múltiples segundos amplificadores. El primer amplificador es capaz de hibridarse con el primer preamplificador y con múltiples primeras sondas de etiqueta, y el segundo amplificador es capaz de hibridarse con el segundo preamplificador y con múltiples segundas sondas de etiqueta. En una clase relacionada de ejemplos, la composición incluye dos o más primeras sondas de captura, dos o más segundas sondas de captura, múltiples de las primeras sondas de etiqueta, múltiples de las segundas sondas de etiqueta, múltiples primeros amplificadores, múltiples segundos amplificadores, múltiples primeros preamplificadores y múltiples segundos preamplificadores. El primer preamplificador es capaz de hibridarse con una de las primeras sondas de captura y con múltiples primeros amplificadores, el segundo preamplificador es capaz de hibridarse con una de las segundas sondas de captura y con múltiples segundos amplificadores, el primer amplificador es capaz de hibridarse con el primer preamplificador y con múltiples primeras sondas de etiqueta, y el segundo amplificador es capaz de hibridarse con el segundo preamplificador y con múltiples segundas sondas de etiqueta. Opcionalmente, se pueden usar preamplificadores adicionales como intermedios entre un preamplificador hibridado con una o más sondas de captura y los amplificadores.

En las clases anteriores de ejemplos, una sonda de captura se hibrida con cada sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador. En clases alternativas de ejemplos relacionados, dos o más sondas de captura se hibridan con la sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador.

En una clase de ejemplos, la composición comprende múltiples primeras sondas de etiqueta, múltiples segundas sondas de etiqueta, un primer polinucleótido amplificado producido mediante amplificación por círculo rodante de un primer polinucleótido circular hibridado con la primera sonda de captura, y un segundo polinucleótido amplificado producido mediante amplificación por círculo rodante de un segundo polinucleótido circular hibridado con la segunda sonda de captura. El primer polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la primera sonda de etiqueta, y el primer polinucleótido amplificado, comprende múltiples copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la primera sonda de etiqueta (y, por lo tanto, se hibrida con múltiples sondas de etiqueta). El segundo polinucleótido circular comprende al menos una copia de una secuencia de polinucleótidos idéntica a una secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda de etiqueta, y el segundo polinucleótido amplificado, comprende múltiples copias de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de polinucleótidos en la segunda sonda de etiqueta. La composición también puede incluir reactivos necesarios para producir los polinucleótidos amplificados, por ejemplo, una polimerasa de ácido nucleico suministrada de forma exógena, una ligasa de ácido nucleico suministrada de forma exógena y/o trifosfatos de nucleósido suministrados de forma exógena (por ejemplo, dNTP).

La célula incluye opcionalmente dianas de ácido nucleico adicionales, y la composición (y célula) puede incluir reactivos para la detección de estas dianas. Por ejemplo, la célula puede comprender o es posible sospechar que comprenda una tercera diana de ácido nucleico, y la composición puede incluir al menos una tercera sonda de captura capaz de hibridarse con la tercera diana de ácido nucleico y una tercera sonda de etiqueta que comprende una tercera etiqueta. Una tercera señal de la tercera etiqueta se puede distinguir de las primeras y segundas señales. La célula incluye opcionalmente cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico, y la composición incluye opcionalmente cuartas, quintas, sextas, etc. sondas de etiqueta y sondas de captura.

Básicamente todas las características mencionadas de los métodos anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente, por ejemplo, con respecto al tipo de diana de ácido nucleico, ubicación de varias dianas en una única molécula o en distintas moléculas, tipo de etiqueta, inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares. Por ejemplo, cabe destacar que la segunda diana de ácido nucleico comprende opcionalmente un ácido nucleico de referencia. En otras realizaciones, las primeras y segundas dianas de ácido nucleico sirven como marcadores para un tipo celular determinado, por ejemplo, marcadores redundantes.

La célula puede ser básicamente cualquier tipo celular de cualquier origen, particularmente una célula que se puede diferenciar en función de su contenido de ácido nucleico (presencia, ausencia o cantidad de copias de uno o más ácidos nucleicos). Simplemente como algunos ejemplos, la célula puede ser una célula tumoral en circulación u otra célula tumoral, una célula infectada viralmente, una célula fetal en sangre materna, una célula bacteriana u otro microorganismo en una muestra biológica (por ejemplo, sangre u otro fluido corporal), o una célula endotelial, célula endotelial precursora, o célula de miocardio en sangre. Por ejemplo, la célula se puede obtener de un fluido corporal, sangre, médula ósea, esputo, orina, ganglio linfático, heces, prueba de PAP de cuello uterino, muestra oral u otra muestra, fluido espinal, saliva, esputo, semen, fluido linfático, un fluido intercelular, un tejido (por ejemplo, un homogenado de tejido), una biopsia y/o un tumor. La célula se encuentra opcionalmente en un tejido, por ejemplo, una sección de tejido (por ejemplo, una sección FFPE) u otra muestra de tejido sólido. La célula puede obtenerse de uno o más de un humano, un animal, una planta y una célula cultivada.

La célula puede estar presente en una mezcla de células, por ejemplo, una mezcla heterogénea compleja. En una clase de ejemplos, la célula es de un tipo determinado, y la composición comprende uno o más de otros tipos celulares. Estas otras células pueden estar presentes más, incluso mucho más, que la célula. Por ejemplo, la relación de células del tipo determinado a células de todos los otros tipos en la composición es opcionalmente inferior a 1:1x10⁴, inferior a 1:1x10⁵, inferior a 1:1x10⁶, inferior a 1:1x10⁷, inferior a 1:1x10⁸ o incluso inferior a 1:1x10⁹.

La célula se inmoviliza opcionalmente en un sustrato, presente en una sección de tejido, o similar. Sin embargo, en determinados ejemplos, la célula se encuentra en suspensión en la composición. La composición puede estar contenida en un citómetro de flujo o en un instrumento similar. Las características adicionales que se describen en la presente, por ejemplo, en la sección titulada «Implementación, aplicaciones y ventajas» se pueden aplicar a las composiciones, según sea pertinente.

Otro aspecto de la solicitud proporciona composiciones en las cuales una gran cantidad de etiquetas se correlaciona con cada ácido nucleico diana. Una clase general de ejemplos, por lo tanto, proporciona una composición que comprende una célula, la cual incluye una primera diana de ácido nucleico, una segunda diana de ácido nucleico, una primera etiqueta cuya presencia en la célula indica la presencia de la primera diana de ácido nucleico en la célula, y una segunda etiqueta cuya presencia en la célula indica la presencia de la segunda diana de ácido nucleico en la célula, en donde una primera señal de la primera etiqueta se puede distinguir de una segunda señal de la segunda etiqueta. Un promedio de al menos una copia de la primera etiqueta está presente en la célula por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y un promedio de al menos una copia de la segunda etiqueta está presente en la célula por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico.

En una clase de realizaciones, las copias de la primera etiqueta están físicamente asociadas con la primera diana de ácido nucleico, y las copias de la segunda etiqueta están físicamente asociadas con la segunda diana de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera etiqueta puede formar parte de una primera sonda de etiqueta y la segunda sonda de etiqueta puede formar parte de una segunda sonda de etiqueta, en donde las sondas de etiqueta se captan en los ácidos nucleicos diana.

En una clase de realizaciones, un promedio de al menos cuatro, ocho o doce copias de la primera etiqueta están presentes en la célula por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y un promedio de al menos cuatro, ocho o doce copias de la segunda etiqueta están presentes en la célula por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico. En una realización, un promedio de al menos dieciséis copias de la primera etiqueta están presentes en la célula por nucleótido de la primera diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la primera diana de ácido nucleico, y un promedio de al menos dieciséis copias de la segunda etiqueta están presentes en la célula por nucleótido de la segunda diana de ácido nucleico en una región que abarca al menos 20 nucleótidos contiguos de la segunda diana de ácido nucleico.

Básicamente todas las características mencionadas de las realizaciones anteriores aplican a estas realizaciones también, según sea pertinente, por ejemplo, con respecto al tipo de etiquetas, suspensión de la célula o presencia de la célula en una sección de tejido, y/o similares. Las regiones de las primeras y segundas dianas de ácido nucleico comúnmente son regiones cubiertas por una sonda, cebador o polinucleótido similar empleado para detectar la diana respectiva. Las regiones de las primeras y segundas dianas de ácido nucleico abarcan opcionalmente al menos 25, 50, 100, 200 o más nucleótidos contiguos y/o como máximo 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 o menos nucleótidos. Una densidad similar de etiquetas se capta opcionalmente en terceras, cuartas, quintas, sextas, etc. dianas de ácido nucleico. La composición incluye opcionalmente cebadores de PCR, una polimerasa termoestable y/o similar, en realizaciones en las que las dianas se detectan mediante PCR in situ multiplex.

Otro aspecto de la solicitud proporciona kits útiles para poner en práctica los métodos. Una clase general de ejemplos proporciona un kit para la detección de una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico en una célula individual. El kit incluye al menos un reactivo para fijar y/o permeabilizar la célula, al menos

una primera sonda de captura capaz de hibridarse con la primera diana de ácido nucleico, al menos una segunda sonda de captura capaz de hibridarse con la segunda diana de ácido nucleico, una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una primera señal de la primera etiqueta se puede distinguir de una segunda señal de la segunda etiqueta, envasadas en uno o más recipientes. Básicamente todas las características mencionadas de las realizaciones anteriores aplican a estos ejemplos también, según sea pertinente, por ejemplo, con respecto a la cantidad de dianas de ácido nucleico, configuración y cantidad de las sondas de etiqueta y captura, inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, inclusión de sondas de bloqueo, inclusión de reactivos de amplificación, tipo de diana de ácido nucleico, ubicación de varias dianas en una única molécula o en distintas moléculas, tipo de etiqueta, inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares. El kit también incluye opcionalmente instrucciones para la detección de las dianas de ácido nucleico en la célula y/o la identificación de la célula como de un tipo determinado, una o más soluciones amortiguadas (por ejemplo, diluyente, amortiguador de hibridación y/o amortiguador de lavado), células de referencia que comprenden una o más de las dianas de ácido nucleico, y/o similares.

En la presente se describe un kit para la detección de una célula individual de un tipo determinado a partir de una mezcla de tipos celulares mediante la detección de una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico. El kit incluye al menos un reactivo para fijar y/o permeabilizar la célula, una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta (para la detección de la primera diana de ácido nucleico) y una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta (para la detección de la segunda diana de ácido nucleico), en donde una primera señal de la primera etiqueta se puede distinguir a partir de una segunda señal de la segunda etiqueta, envasadas en uno o más recipientes. El tipo celular determinado se puede distinguir de otros tipos celulares en la mezcla según la presencia, ausencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico en la célula o según la presencia, ausencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula (es decir, las dos dianas son marcadores redundantes del tipo celular determinado).

Básicamente todas las características mencionadas de las realizaciones anteriores aplican a estos ejemplos también, según sea pertinente, por ejemplo, con respecto a la cantidad de dianas de ácido nucleico, inclusión de sondas de captura, configuración y cantidad de las sondas de etiqueta y/o captura, inclusión de preamplificadores y/o amplificadores, inclusión de sondas de bloqueo, inclusión de reactivos de amplificación, tipo de diana de ácido nucleico, ubicación de varias dianas en una única molécula o en distintas moléculas, tipo de etiqueta, inclusión de sondas de bloqueo opcionales, y/o similares. El kit también incluye opcionalmente instrucciones para la identificación de la célula como de un tipo determinado, una o más soluciones amortiguadas (por ejemplo, diluyente, amortiguador de hibridación y/o amortiguador de lavado), células de referencia que comprenden una o más de las dianas de ácido nucleico, y/o similares.

Implementación, aplicaciones y ventajas

A continuación, se describen con más detalles diversos aspectos de la invención. También se describen ejemplos de realizaciones y aplicaciones.

La nueva tecnología (métodos, composiciones, sistemas y kits), QMAGEX (análisis multiplex cuantitativo de expresión génica en células individuales) que se describe en la presente es capaz de detectar y cuantificar múltiples ácidos nucleicos dentro de células individuales. La tecnología es significativamente distinta de la tecnología ISH existente en varios aspectos, si bien ambas pueden medir la expresión de ARNm en células individuales. En primer lugar, las células permanecen opcionalmente en estado de suspensión durante la totalidad o al menos la mayoría de las etapas de ensayo en los ensayos de la presente invención, lo que mejora mucho la cinética de hibridación del ensayo, y genera una mejor capacidad de reproducción y un menor periodo de ensayo. En segundo lugar, la tecnología de la presente tiene la capacidad de analizar la expresión de múltiples transcripciones de ARNm dentro de las células de manera simultánea y cuantitativa. Esto es muy deseable dado que, por ejemplo, la detección de múltiples genes marcadores tumorales podría mejorar mucho la precisión de la identificación de CTC (Mocellin et ál., 2004) y reducir mucho el índice de falsos positivos. El análisis cuantitativo del nivel de expresión génica no solo podría ayudar aun más a diferenciar las CTC de otros tipos de células, sino que también podría ayudar a diferenciar el tipo y origen de tumores primarios, así como las etapas de evolución tumoral. En tercer lugar, la tecnología de la presente permite el uso de un citómetro de flujo como base de detección que, en comparación con los instrumentos de detección basados en microscopio, ofrece un mayor rendimiento. Además, el citómetro de flujo es capaz de clasificar las células, por ejemplo, células tumorales, para estudio adicional. Luego de la detección y cuantificación de la expresión de ARNm, el aislamiento de las CTC u otras células puede ser ventajoso para la confirmación adicional de la identidad o para análisis citológico y molecular adicional. En cuarto lugar, la tecnología de la presente ha mejorado mucho la sensibilidad y capacidad de reproducción de la detección, y es capaz de detección y cuantificación de genes de una sola copia. Además, la tecnología de la presente usa un conjunto genérico estándar de tecnología de etiquetado y detección de sondas (por ejemplo, el mismo conjunto de preamplificadores, amplificadores y sondas de etiqueta se pueden usar para detectar múltiples conjuntos distintos de dianas de ácido nucleico, lo que requiere solamente la síntesis de un nuevo conjunto de sondas de captura para cada nuevo conjunto de dianas de ácido nucleico) y usa opcionalmente procedimientos estándar para la fijación y permeación de células y para hibridación y lavado. Además, la tecnología puede incluir controles internos integrados para especificidad y eficacia del ensayo.

La tecnología de la presente se puede usar no solamente para la detección y enumeración de CTC raras en muestras de sangre u otros fluidos corporales, sino también para eventos de identificación y enumeración de cualquier tipo de célula rara. Las aplicaciones incluyen, de modo no taxativo: detección de enfermedad residual mínima en leucemia y linfoma; control de reaparición después de tratamiento con quimioterapia (Hess et ál.);
 5 detección de otras células pre-cancerosas, tales como la detección de células de cuello uterino que contienen HPV en fluidos corporales; detección de ácido nucleico viral o bacteriano en una célula infectada; detección de células fetales en sangre materna; detección de lesiones microtumoraes durante la etapa temprana del crecimiento tumoral; o detección de células tumorales residuales después de cirugía para gestión del margen. En todos estos casos, es probable que la expresión génica de células diana esté oculta en el entorno de grandes cantidades de poblaciones
 10 celulares heterogéneas. Como resultado, el análisis de expresión basado en microconjunto o RT-PCR, que requieren el aislamiento de ARNm de una gran población de células, tendrá dificultad para detectar la presencia de aquellos eventos de células raras de manera precisa o fiable, mientras que la tecnología inventada puede aplicarse fácilmente.

También cabe destacar que si bien la detección y cuantificación de células individuales de múltiples transcripciones de ARNm se ilustran en la presente como la principal aplicación, dicha tecnología es igualmente aplicable a la detección de otros eventos de células raras que incluyen cambios en el ADN cromosómico o contenido de ácido nucleico celular. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a detección de amplificación génica de her-2/neu, detección de eliminación génica de Rb, detección de mutaciones somáticas, detección de translocaciones cromosómicas, tal como en leucemia mielógena crónica (BCR-ABL), o detección de inserción de HPV en ADN cromosómico de células cancerosas de cuello uterino.
 15
 20

Por último, el diseño de la sonda, los aspectos de multiplexación y amplificación de la tecnología de la presente se pueden aplicar en análisis de expresión génica multiplex cuantitativo y en la medición de los cambios de ADN cromosómico a nivel de una única célula en secciones de tejido sólido, tales como muestras de tejido incrustada en parafina y fijada en formalina (FFPE).

25 La tecnología QMAGEX comprende un ensayo y un aparato asociado opcional para implementar el ensayo de manera automática. La Figura 1 ilustra los elementos principales del flujo de trabajo del ensayo QMAGEX que, para un ejemplo de realización en el que las células se encuentran en suspensión y se emplean amplificadores; incluyen:

30 Fijación y permeación: Las células en la muestra se fijan y permean (permeabilizan) en suspensión. La etapa de fijación inmoviliza los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm o ADN cromosómico) y los reticula en la estructura celular. Luego, la membrana celular se permeabiliza para que las sondas de ácido nucleico específicas de la diana y las partículas que generan señales, tales como las sondas de ácido nucleico etiquetadas de manera fluorescente, puedan ingresar en la célula y unirse a la diana.

35 Desnaturalización: Si la diana de detección es ADN cromosómico de cadena doble, se agrega una etapa de desnaturalización para convertir la diana de cadena doble en ADN de cadena simple, listo para unirse a las sondas específicas de la diana.

40 Hibridación de sondas de captura: Sondas de captura específicas de la diana y seleccionadas cuidadosamente, o conjuntos de sondas, se hibridan con los ácidos nucleicos diana. Las sondas de captura sirven para unir las moléculas diana específicamente a las partículas que generan señales. La tecnología permite que se reconozcan múltiples genes diana en la célula mediante distintos conjuntos de sondas de manera simultánea y con un grado elevado de especificidad.

Amplificación de señales: Las señales de moléculas diana se amplifican mediante la unión de una molécula de andamiaje grande, un amplificador a las sondas de captura o conjuntos de sondas. Cada andamiaje tiene múltiples ubicaciones para aceptar sondas de etiqueta y partículas que generan señales. En un ensayo multiplex, se usan múltiples amplificadores distintos.

45 Etiquetado: Las sondas de etiqueta, a las cuales se unen las partículas que generan señales (etiquetas), se hibridan con el amplificador en esta etapa. En un ensayo multiplex, se usan múltiples sondas de etiqueta distintas.

50 Lavado: Las sondas en exceso o las partículas que generan señales que no se unen o que se unen de forma no específica a las células se retiran a través de una etapa de lavado, que reduce el ruido de fondo y mejora la relación de señal de detección a ruido. Las etapas de lavado adicionales se pueden agregar durante las etapas de hibridación de sondas de captura o amplificación de señales para potenciar aun más el rendimiento del ensayo.

Detección: Las células de suspensión etiquetadas se detectan usando clasificación de células con activación fluorescente (FACS) o un citómetro de flujo, o se inmovilizan en una superficie sólida y se detectan usando un microscopio o instrumento basado en escaneo.

55 En la siguiente sección, la mayoría de los elementos de la tecnología QMAGEX se describirá en detalle. A continuación, la expresión sonda de etiqueta se refiere a una entidad que se une a la molécula diana, directa o indirectamente, y permite que se detecte la diana mediante un instrumento de lectura. En general, la sonda de etiqueta comprende una molécula de ácido nucleico o ácido nucleico modificado que se une a la diana, directa o

indirectamente, y una o más «partículas que generan señales» (es decir, etiqueta) que producen la señal que puede ser reconocida por el instrumento de lectura. preferiblemente, la sonda de etiqueta comprende un oligo de cadena simple relativamente corta con la etiqueta unida a un extremo de la cadena oligo. En otra realización, la sonda de etiqueta también puede ser una molécula relativamente más grande, que puede ser un oligo de cadena simple más larga o una molécula de estructura ramificada, lo que permite la unión de múltiples etiquetas. En modo indirecto, la sonda de etiqueta se puede unir a la molécula diana mediante la unión a una sonda de captura directamente o mediante la unión a un amplificador que, a su vez, se une a una sonda de captura. Ejemplos de partículas que generan señales (etiquetas) incluyen, pero no se limitan a moléculas fluorescentes, nanopartículas, isótopos radioactivos, moléculas quimioluminiscentes (por ejemplo, digoxigenina, dinitrofenilo). Las moléculas fluorescentes incluyen, pero no se limitan a fluoresceína (FITC), cy3, cy5, tintes alexa, ficoeritrina, etc. Las nanopartículas incluyen, pero no se limitan a puntos cuánticos fluorescentes, partículas de dispersión, etc. La expresión sonda de captura se refiere a un ácido nucleico o un ácido nucleico modificado que se une a la diana en un tipo específico de sonda de etiqueta, directa o indirectamente. La sonda de captura tiene una sección de secuencia complementaria a la diana y una o múltiples secciones de secuencias complementarias a sondas de etiqueta o amplificadores o preamplificadores. La expresión «conjunto de sondas de captura» se refiere a múltiples ácidos nucleicos o ácidos nucleicos modificados que se unen a una diana en un tipo específico de sonda de etiqueta, directa o indirectamente, para aumentar la sensibilidad del ensayo. El término amplificador se refiere a una o más moléculas de andamiaje grandes que se une a una o más sondas de captura o a un amplificador en un lado y a múltiples sondas de etiqueta en otro lado.

20 Fijación

En esta etapa, los ácidos nucleicos se inmovilizan dentro de las células mediante su reticulación dentro de la estructura celular. Existen diversos métodos conocidos para fijar células en suspensión con un reactivo de fijación y para bloquear la actividad de ARNasa endógena, que se pueden adaptar para su uso en la presente invención. Los reactivos de fijación incluyen formalina (formaldehído), paraformaldeído, glutaraldehído, etanol, metanol, etc. Una solución de fijación común para secciones de tejido incluye 0.25 % de glutaraldehído y 4 % de paraformaldehído en amortiguador de fosfato. Otra solución de fijación común para secciones de tejido incluye 50 % de etanol, 10 % de formalina (que contiene 37 % de formaldehído) y 5 % de ácido acético. Diferentes combinaciones de los reactivos de fijación en varias concentraciones se analizan opcionalmente para encontrar la composición óptima para fijar células en suspensión, usando técnicas conocidas en la técnica. También es posible optimizar la duración del tratamiento de fijación. Es posible incluir diversos inhibidores de ARNasa en la solución de fijación, tales como RNAlater (Ambion), ácido cítrico o LiCl, etc.

Permeación

Los resultados de fijación en la reticulación de los ácidos nucleicos diana con proteínas u otros componentes celulares dentro de las células, que puede obstaculizar o evitar la infiltración de las sondas de captura en las células y enmascarar las moléculas diana para hibridación. Por lo tanto, los ensayos de la invención incluyen comúnmente una etapa de permeación de seguimiento para permitir la hibridación en célula. Una técnica implica la aplicación de calor durante diversos periodos de tiempo para romper la reticulación. Esto se ha demostrado para aumentar la accesibilidad del ARNm en las células para la hibridación. También es posible usar detergentes (por ejemplo, Triton X-100 o SDS) y Proteinasa K para aumentar la permeabilidad de las células fijadas. El tratamiento con detergente, comúnmente con Triton X-100 o SDS, se usa frecuentemente para permear las membranas al extraer los lípidos. Proteinasa K es una proteasa no específica que es activa en un amplio espectro de pH y no se inactiva fácilmente. Se usa para digerir las proteínas que rodean el ARNm diana. Nuevamente, las concentraciones y duración óptimas de tratamiento se pueden determinar de manera experimental como se conoce en la técnica. A esto le puede seguir una etapa de lavado de las células, para retirar los materiales disueltos producidos en la etapa de permeación.

Opcionalmente, antes de la fijación y permeación, se recogen las células en suspensión y se tratan para inactivar la ARNasa y/o para reducir la autofluorescencia. El tratamiento con DEPC (por ejemplo, Braissant y Wahli (1988) "A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections" *Biochemica* 1:10-16) y RNAlater (Ambion, Inc.) ha demostrado ser eficaz en la estabilización y protección de ARN celular. El borohidruro de sodio y el calor elevado también han demostrado conservar la integridad del ARN y reducir la autofluorescencia, lo que facilita la detección de los genes expresados a nivel bajo (Capodiecì et ál. (2005) "Gene expression profiling in single cells within tissue" *Nat Methods* 2(9):663-5). Opcionalmente, se emplean otros métodos de reducción de la autofluorescencia celular, tal como azul de tripano (Mosiman et ál. (1997) "Reducing cellular auto fluorescence in flow cytometry: an in situ method" *Cytometry* 30(3): 151-6) o sonda de oligonucleótido inactivador etiquetado de forma individual (Nolan et ál. (2003) "A simple quenching method for fluorescence background reduction and its application to the direct, quantitative detection of specific mRNA" *Anal Chem.* 2003 75(22):6236-43).

Hibridación de sondas de captura

En esta etapa del ensayo, la sonda de captura o el conjunto de sondas de captura se unen a la molécula diana prevista mediante hibridación. Un indicador para una hibridación diana satisfactoria es la especificidad, es decir, las sondas de captura o conjuntos de sondas deberían unir básicamente solo las sondas de etiqueta a la molécula diana

específica de interés, y no a ninguna otra molécula. La selección y el diseño de sondas son importantes para lograr la hibridación específica.

Selección y diseño de sondas

5 Los ensayos pueden emplear dos tipos de enfoques en el diseño de sondas para unir los ácidos nucleicos diana en células a partículas que generan señales: «etiquetado directo» y «etiquetado indirecto». En el enfoque de etiquetado directo, la molécula diana se hibrida con o capta una o más sondas de etiqueta (LP) directamente. Las LP contienen las partículas que generan señales (SGP), como se muestra en la Figura 2. Se debe usar una LP distinta para unir SGP adicionales en distintas posiciones en la molécula diana. Para garantizar la especificidad de hibridación, la sonda de etiqueta se selecciona preferiblemente de manera rigurosa para garantizar que no presente hibridación cruzada con secuencias de ácido nucleico no específicas.

10 En el enfoque de etiquetado indirecto, se emplea una sonda de captura (CP) adicional. Se muestra un ejemplo en la Figura 3. La molécula diana capta la sonda de etiqueta a través de la sonda de captura. En cada sonda de captura, hay al menos una sección, T, complementaria a una sección en la molécula diana, y otra sección, L, complementaria a una sección en la sonda de etiqueta. Las secciones T y L se conectan mediante una sección C. Para unir más SGP a distintas posiciones en la misma molécula diana, se requieren distintas sondas de captura, pero la sonda de etiqueta puede permanecer igual. La secuencia de L se selecciona cuidadosamente para garantizar que no presente hibridación cruzada básicamente con cualquier secuencia en los ácidos nucleicos en células. En una realización adicional, la parte L de la sonda de captura y la sonda de etiqueta contienen nucleótidos no naturales o modificados químicamente que no se hibridan con nucleótidos naturales en células. En otra realización, L y la sonda de etiqueta (o una parte de esta) y no incluso secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, L puede ser un anticuerpo de unión con afinidad débil que reconoce la sonda que genera señales que, en este caso es o incluye un antígeno; L se puede conjugar covalentemente con un oligonucleótido que comprende la sección T de la sonda de captura. Opcionalmente, para dos sondas de captura adyacentes, las secciones T se hibridan con la diana y dos del anticuerpo de unión con baja afinidad se unen al antígeno en la sonda de etiqueta al mismo tiempo, lo que genera la unión con afinidad fuerte del antígeno. Las sondas de captura y etiqueta son específicas para un gen diana de interés. Múltiples sondas de captura (conjunto de sondas) se pueden unir al mismo gen diana de interés para unir más partículas que generan señales para una mayor sensibilidad de detección. En esta situación, el conjunto de sondas para el mismo gen diana puede compartir la misma sonda de etiqueta.

20 Si bien ambos enfoques se pueden usar en la tecnología de la presente, el enfoque de captura indirecta se prefiere dado que permite que la sonda de etiqueta sea independiente de la diana y la descripción adicional mostrará que puede ofrecer una mejor especificidad y sensibilidad.

25 En una realización de captura indirecta adicional que se muestra en la Figura 4, se incorporan dos sondas de captura adyacentes en un conjunto de sondas que se dirigen a un gen de interés. T1 y T2 están diseñados para que sean complementarios a dos secciones únicas y adyacentes en el ácido nucleico diana. L1 y L2, que pueden ser diferentes o iguales, son complementarios a dos secciones adyacentes en la sonda de etiqueta. Sus secciones de unión, T, L o ambas, están diseñadas para que el enlace entre la sonda de etiqueta y la diana sea inestable y tienda a disminuir a una temperatura de hibridación cuando se encuentra solamente una de las sondas de captura. Dicho diseño debería permitir la especificidad excepcional dado que la sonda de etiqueta que genera señales solamente puede unirse al gen diana de interés cuando dos sondas de captura independientes reconocen la diana y se unen a las secuencias adyacentes o a muy poca distancia del gen diana. En una realización, la temperatura de fusión, T_m , de las secciones T de las dos sondas de captura está diseñada para que sea significativamente superior a la temperatura de hibridación, mientras que la T_m de las secciones L es inferior a la temperatura de hibridación. Como resultado, las secciones T se unen a la molécula diana fuerte y establemente durante la hibridación, mientras que las secciones L se unen a la sonda de etiqueta débil e inestablemente si solamente una de las sondas de captura está presente. Sin embargo, si ambas sondas de captura están presentes, la combinación de L1 y L2 sostiene la sonda de etiqueta fuerte y establemente durante la hibridación. Por ejemplo, las secciones T pueden tener 20-30 nucleótidos de longitud, mientras que las secciones L tienen 13-15 nucleótidos de longitud; C puede tener de 0 a 10 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 5 nucleótidos. En otra realización, la T_m de las secciones T se encuentra por debajo de la temperatura de hibridación, mientras que la T_m de las secciones L se encuentra sustancialmente por encima. Del mismo modo, el enlace entre la sonda de etiqueta y la diana solamente puede sobrevivir a la hibridación cuando ambas sondas de captura se hibridan con la diana de manera cooperativa. Ver el Ejemplo 1 más adelante y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2007/0015188 titulada "Multiplex detection of nucleic acids" de Luo et ál. para obtener detalles adicionales sobre el diseño de las sondas de captura.

30 En otra realización, se usan tres o más sondas de captura cercanas específicas del ácido nucleico diana específico para la captura estable de una sonda de etiqueta dentro de las células (Figura 5). El diseño básico de las sondas es el mismo que se describió anteriormente, pero la captura de una sonda que genera señales debería tener una especificidad incluso mayor que cuando se usan dos sondas cercanas dado que ahora se deben unir tres sondas independientes a la misma molécula diana de interés en posiciones cercanas para generar la señal.

35 Será evidente que, si bien las realizaciones anteriores se describen en términos de configuraciones de sondas de captura, como las que se muestran en las Figuras 3-5 y Figura 19 Paneles A-B, fácilmente se pueden emplear otras

configuraciones de sondas de captura. Ejemplos adicionales de configuraciones de sondas de captura que se pueden adaptar a la práctica de la presente invención se ilustran en la Figura 19 Panles C-I. Al igual que para las realizaciones anteriores, dos, tres o más de dichas sondas de captura se pueden unir a una única sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador. También como se describió anteriormente, opcionalmente las secciones T, L o ambas están diseñadas de manera que la captura estable de la sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador requiera la unión de más de una de las sondas de captura. Por ejemplo, las secciones T pueden tener 20-30 nucleótidos de longitud, mientras que las secciones L tienen 13-15 nucleótidos de longitud; C puede tener de 0-10 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 5 nucleótidos. Cabe destacar que, en determinadas configuraciones, los extremos de las sondas de captura adyacentes pueden ligarse opcionalmente entre sí cuando las sondas de captura se unen al ácido nucleico diana y/o la sonda de etiqueta, amplificador o preamplificador; ver la Figura 19 Paneles C, D y G.

Multiplexación

Para realizar detección multiplexada para más de un gen diana, por ejemplo, como se muestra en la Figura 6, cada gen diana debe unirse específicamente mediante distintas sondas de captura y etiqueta. Además, la partícula que genera señales (la etiqueta) unida a la sonda de etiqueta debería proporcionar señales notoriamente distintas para cada diana que se pueden leer mediante el instrumento de detección. En el enfoque de etiquetado directo (por ejemplo, Figura 6 Panel A), las sondas de etiqueta adecuadas con mínima hibridación cruzada pueden ser difíciles de encontrar dado que cada sonda de etiqueta debe poder unirse a la diana de manera potente pero sin presentar hibridación cruzada con cualquier otra molécula de ácido nucleico en el sistema. Para que este enfoque proporcione resultados óptimos, la parte que se une a la diana de la sonda de etiqueta debería diseñarse de manera sensata para que no presente hibridación cruzada considerable con secuencias no específicas. En el enfoque de etiquetado indirecto (por ejemplo, Figura 6 Panel B), debido al enfoque de diseño de múltiples sondas de captura exclusivo, incluso cuando una sonda de captura se une a una diana no específica, no generará la unión de la sonda de etiqueta con la diana no específica. La especificidad del ensayo puede mejorar enormemente. Por lo tanto, el diseño de la sonda de captura ilustrado en la Figura 4 y en la Figura 5 se prefiere comúnmente en algunas aplicaciones de ensayo multiplex. Por ejemplo, las partículas que generan señales unidas a distintos genes diana son moléculas fluorescentes diferentes con espectros de emisión distintivos.

La capacidad de la tecnología de la presente para medir más de un parámetro de manera simultánea puede permitir la detección de células raras en una población celular heterogénea grande. Como se mencionó anteriormente, se calcula que la concentración de CTC se encuentra en el intervalo de una célula tumoral cada 10⁶-10⁷ células sanguíneas normales. En los inmunoensayos basados en FACS existentes, por otro lado, la agregación de tintes aleatorios en las células puede producir un conteo de células falso positivo cada diez mil células. Por lo tanto, dicho ensayo no se puede usar para la detección de CTC debido a los índices de falsos positivos inaceptablemente elevados. Este problema se puede resolver de manera elegante usando la tecnología de la presente. En particular, la expresión de más de un gen tumoral se usa como la diana para la detección multiplex. Solamente las células que expresan todos los genes diana se contabilizan como células tumorales. De esta manera, el índice de falsos positivos de la detección de CTC se puede reducir drásticamente. Por ejemplo, dado que la agregación de tinte en las células es un evento aleatorio, si el índice de falsos positivos de detección de un solo color es de 10⁻⁴, el índice de falsos positivos para la detección de dos colores o tres colores puede ser tan bajo como 10⁻⁸ o 10⁻¹², respectivamente. En las situaciones en las que los niveles relativos de expresión de los genes diana son conocidos, estos niveles relativos se pueden medir usando los métodos de detección multiplex que se describen en la presente y la información se puede usar para reducir aun más el índice de falsos negativos de la detección.

En otro ejemplo, esquemáticamente ilustradas en la Figura 7 Panel A, más de una partícula que genera señales se une al mismo ácido nucleico diana. Estas partículas generan distintas señales en el instrumento de detección. Las potencias relativas de estas señales se pueden determinar previamente al diseñar la cantidad de cada tipo de partículas unidas a la diana. La cantidad de partículas que generan señales en una diana se puede controlar en el diseño de sonda mediante el cambio en la cantidad de conjuntos de sondas o mediante el uso de distintos métodos de amplificación de señales, por ejemplo, como se describe en la siguiente sección. Las células raras se identifican solamente cuando la potencia relativa de la señal de estas partículas medida con el instrumento de detección equivale a los valores predeterminados. La presente realización es útil cuando no hay suficientes marcadores adecuados o cuando sus niveles de expresión son desconocidos en un tipo de células raras en particular. En aun otra realización, que se muestra en la Figura 7 Panel B, el mismo conjunto de partículas que generan señales se une a más de una diana. La potencia relativa de la señal del conjunto de partículas se controla para que sea igual en todas las dianas seleccionadas. La presente realización es útil en situaciones en las que la célula rara se identifica cuando cualquiera de las moléculas diana está presente. En aun otra realización, que se ilustra en la Figura 7 Panel C, cada molécula diana tiene un conjunto de partículas que generan señales unidas a esta, pero los conjuntos de partículas son notoriamente distintos de diana a diana.

La detección de múltiples especies de ácidos nucleicos diana de interés se puede aplicar a la medición cuantitativa de una diana. Debido a diferentes condiciones experimentales y de la muestra, la abundancia de una molécula diana particular en una célula normalmente no puede determinarse de manera cuantitativa mediante la detección del nivel de señal asociado con la diana solo en realizaciones en las que se miden los niveles de intensidad. La medición más precisa se puede lograr posiblemente mediante la normalización de la señal de un gen de interés con aquella de un

gen de referencia/constitutivo. Un gen de referencia/constitutivo se define como un gen que generalmente siempre está presente o expresado en las células. La expresión del gen de referencia/constitutivo es generalmente constitutiva y tiende a no cambiar en diferentes condiciones biológicas. 18S, 28S, GAPD, ACTB, PPIB etc. se han considerado generalmente como genes de referencia o constitutivos, y se han usado en la normalización de datos de expresión génica generados a partir de distintas muestras y/o en diversas condiciones de ensayo.

En otra realización, es posible diseñar un conjunto de sondas de etiqueta especial que no se une a ninguna sonda de captura o diana de manera específica. La señal asociada con esta sonda de etiqueta se puede usar para establecer el entorno de la señal de hibridación en células individuales. Por lo tanto, la abundancia de una molécula diana particular se puede determinar de manera cuantitativa al restar en primer lugar la señal de hibridación de fondo, normalizando contra la señal de hibridación del gen de referencia/constitutivo restado del entorno.

En aun otra realización, se pueden detectar dos o más secuencias de ADN cromosómico de interés de manera simultánea en las células. En la detección de múltiples secuencias de ADN en las células, las sondas de etiqueta para las secuencias de ADN son distintas entre sí y no presentan hibridación cruzada entre sí. En las realizaciones en las que se emplea captura indirecta cooperativa, debido al esquema de diseño, incluso cuando una sonda se une a una secuencia de ADN no específica, no generará la captura de la sonda que genera señales en las secuencias de ADN no específicas.

En aun otro ejemplo, la detección de múltiples secuencias de ADN cromosómico diana de interés permite el análisis cuantitativo de amplificación génica, eliminación génica o translocación génica en células individuales. Esto se logra mediante la normalización de la señal de un gen de interés con aquella de un gen de referencia. La relación de señal del gen de interés con el gen de referencia para una célula particular de interés se compara con la relación en las células de referencia. Un gen de referencia se define como un gen que se mantiene de manera estable en cantidad de copias en el ADN genómico. Una célula de referencia se define como una célula que contiene la cantidad de copias normal del gen de interés y el gen de referencia. Si la relación de señal es superior en las células de interés en comparación con las células de referencia, se detecta la amplificación génica. Si la relación es inferior en las células de interés en comparación con las células de referencia, se detecta la eliminación génica.

Amplificación y etiquetado de señales

El enfoque de etiquetado directo ilustrado en la Figura 2 y en la Figura 6 Panel A ofrece solamente sensibilidad limitada dado que solamente una cantidad relativamente pequeña de partículas que generan señales (etiquetas) puede unirse a cada sonda de etiqueta.

Es evidente que cuantas más etiquetas o partículas que generan señales (SGP) se unan a una copia de la diana de ácido nucleico, más fuerte será la señal, más sensible será el ensayo. En una realización, la sonda de etiqueta es un oligo de cadena simple corta con una SGP unida a un extremo del oligo. En otra realización, la sonda de etiqueta es un oligo de cadena simple corta con una SGP unida a cada extremo del oligo, duplicando eficazmente la potencia de la señal. En aun otra realización, que se muestra en la Figura 26, la sonda de etiqueta es un oligo de cadena simple más larga con muchas SGP unidas al oligo. Una forma de alcanzar esto es utilizar el ARN transcrito in vitro que incorpora las partículas que generan señales. El Panel A muestra una sonda de etiqueta grande que comprende múltiples partículas de etiquetas o moléculas captadas por una sonda de captura. El Panel B muestra una única sonda de etiqueta grande captada por cada una de dos o más sondas de captura. La Figura 8 muestra el uso de una sonda de etiqueta grande con un amplificador captado simultáneamente en dos o más sondas de captura.

El enfoque de «etiquetado indirecto» no solamente puede mejorar la especificidad, como se describió anteriormente, sino que también se puede usar para mejorar la sensibilidad de detección. En este enfoque, la sonda de etiqueta se hibrida o conecta con una molécula amplificadora, que proporciona muchos más sitios de unión para las sondas de etiqueta. La estructura y el método de unión del amplificador pueden adoptar muchas formas. Los Paneles A-D de la Figura 9 muestran una cantidad de esquemas de amplificación como ejemplos ilustrativos. En el Panel A, las múltiples sondas de etiqueta de una sola etiqueta se unen al amplificador. En el Panel B, las múltiples sondas de etiqueta de múltiples etiquetas se unen al amplificador. En el Panel C, las múltiples sondas de etiqueta de una sola etiqueta se unen al amplificador, y múltiples copias del amplificador se unen a un preamplificador. En una realización particular, el amplificador es una o múltiples moléculas de ADN ramificadas (Panel D). La secuencia de la sonda de etiqueta se selecciona preferiblemente de manera cuidadosa para que no presente hibridación cruzada considerable con ningún ácido nucleico endógeno en la célula. De hecho, la sonda de etiqueta no tiene que ser una molécula de polinucleótido natural. La modificación química de la molécula, por ejemplo, la inclusión de nucleótidos no naturales, puede garantizar que la sonda de etiqueta solamente se hibride con el amplificador y no con las moléculas de ácido nucleico que se originan naturalmente en las células. En ensayos multiplex, se diseñarán distintos amplificadores y sondas de etiqueta y se usarán para las distintas dianas.

También es posible aumentar la cantidad de SGP unidas a una copia de la diana de ácido nucleico mediante el aumento del tamaño de las sondas de captura. En una realización, la sonda de captura tiene una sección que tiene una secuencia complementaria con la de la sonda de etiqueta (o amplificador o preamplificador). Por lo tanto, como máximo se puede hibridar una sonda de etiqueta o amplificador o preamplificador con la sonda de captura. En otra realización, como se muestra en la Figura 27, se usa una sonda de captura más grande, que tiene múltiples

secciones complementarias a la de la sonda de etiqueta o amplificador o preamplificador. El Panel A muestra una sonda de captura que captura múltiples sondas de etiqueta, o amplificadores o preamplificadores.

5 El deseo de mejorar la sensibilidad del ensayo puede conllevar intentos de emplear moléculas de sonda de etiqueta más grandes con una cantidad cada vez mayor de etiquetas unidas a la sonda. Sin embargo, es más difícil retirar las moléculas grandes, particularmente aquellas con una estructura ramificada compleja, que no se unen específicamente a la diana de las células en un ensayo de detección in situ. Aquellas sondas de etiqueta unidas de manera no específica aumentarán el entorno, lo que podría conllevar un índice elevado de falsos positivos y una reducción de la especificidad del ensayo. La presente invención usa un conjunto de sondas que comprende 10 múltiples elementos que incluyen la sonda de etiqueta, sonda de captura y opcionalmente el preamplificador y amplificador. El ensayo de la invención construye una gran estructura de moléculas in situ que permite que una gran cantidad de etiquetas (o SGP) se unan a cada copia de la diana, y al mismo tiempo mantengan cada molécula constituyente relativamente pequeña y simple. La técnica de «hibridación colaboradora» descrita anteriormente se emplea para construir el gran «andamiaje» de moléculas. La característica principal de esta técnica es que la condición de formar dicho andamiaje debe ser muy rigurosa y específica; una vez que se forma dicha estructura, debería ser muy estable. El Panel B de la Figura 27 muestra una estructura de andamiaje exclusiva donde dos o 15 más sondas de captura captan de forma conjunta múltiples etiquetas, o amplificadores o preamplificadores.

En una realización, como se ilustra de manera esquemática en la Figura 10, una molécula de polinucleótido circular se capta mediante el conjunto de sondas de captura. A lo largo del círculo, puede haber una secuencia o más de una repetición de la misma secuencia que se une a la sonda de etiqueta (Panel A de Figura 10). En la etapa de 20 amplificación de señales del ensayo, se lleva a cabo un procedimiento de amplificación por círculo rodante (Larsson et ál., 2004). Como resultado de este procedimiento, se produce una molécula de polinucleótido de cadena larga a las sondas de captura (Panel B de Figura 10). Existen muchas secuencias repetitivas a lo largo de la cadena, en la cual las sondas de etiqueta se pueden unir mediante hibridación (Panel C de Figura 10). En ensayos multiplex, se diseñarán y usarán distintas sondas de captura, círculos rodantes y sondas de etiqueta.

25 En una realización, una parte de la sonda que genera señales puede amplificarse por PCR. En otra realización, cada parte de múltiples sondas que generan señales puede amplificarse por PCR de manera simultánea.

Si bien se ha usado un enfoque de captura específico (etiquetado indirecto con pares de sondas de captura) para 30 ilustrar los esquemas de etiquetado y amplificación en las Figuras 8 y 9, es importante destacar que se puede usar cualquier otro enfoque de captura de sonda, directo o indirecto, que se describe en las secciones anteriores junto con los esquemas de etiquetado y amplificación que se describen en estas secciones. La sonda de captura, métodos de etiquetado y configuraciones de amplificador que se describieron anteriormente son independientes entre sí y se pueden usar junto con un diseño de ensayo particular, por ejemplo, en detección in situ o de muestra entera.

Condiciones de hibridación

35 La composición de la solución de hibridación puede afectar la eficacia del proceso de hibridación. La hibridación depende comúnmente de la capacidad del oligonucleótido de hibridarse con una cadena de ARNm complementaria por debajo de su punto de fusión (T_m). El valor de la T_m es la temperatura a la cual la mitad del dúplex de oligonucleótido está presente en una forma de cadena simple. Los factores que influyen en la hibridación de las sondas de oligonucleótido con los ácidos nucleicos diana pueden incluir la temperatura, el pH, la concentración de 40 cationes monovalentes, la presencia de solventes orgánicos, etc. Una solución de hibridación típica puede contener una parte o la totalidad de los siguientes reactivos, por ejemplo, sulfato de dextrano, formamida, DTT (ditiotreitól), SSC (NaCl más citrato de sodio), EDTA, etc. También se pueden agregar otros componentes para disminuir la posibilidad de unión no específica de las sondas de oligonucleótidos, que incluyen, por ejemplo, ADN de cadena simple, ARNt que actúa como ARN portador, poliA, solución de Denhardt, etc. Se pueden encontrar ejemplos de 45 condiciones de hibridación en la técnica y/o se pueden determinar de manera empírica como se conoce en la técnica. Ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2002/0172950, Player et ál. (2001) J. Histochem. Cytochem. 49:603-611, y Kenny et ál. (2002) J. Histochem. Cytochem. 50:1219-1227, que también describen fijación, permeabilización y lavado.

Una prehibridación adicional se lleva a cabo opcionalmente para reducir la tinción de fondo. La prehibridación 50 implica la incubación del tejido fijo o las células con una solución que está compuesta por todos los elementos de la solución de hibridación, menos la sonda.

Lavado

Luego de la etapa de etiquetado, las células se lavan preferiblemente para retirar las sondas no unidas o las sondas 55 que se unieron holgadamente a secuencias con coincidencia imperfecta. El lavado comienza generalmente con un amortiguador de lavado de baja rigurosidad, tal como 2XSSC + 1 mM EDTA (1 X SSC es 0.15M NaCl, 0.015M Na-citrato), seguido de lavado con amortiguador de lavado de mayor rigurosidad, tal como 0.2 X SSC + 1 mM EDTA o 0.1 X SSC + 1 mM EDTA.

El lavado es importante para reducir el ruido de fondo, mejorar la relación de señal a ruido y cuantificación con el

ensayo. Se pueden encontrar procedimientos de lavado establecidos, por ejemplo, en Bauman y Bentvelzen (1988) "Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent in situ hybridization" *Cytometry* 9(6):517-24 y Yu et ál. (1992) "Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry" *Nucleic Acids Res.* 20(1):83-8.

- 5 Se puede lograr el lavado al ejecutar una cantidad adecuada de ciclos de lavado, es decir, uno o más. En general, cada ciclo incluye las siguientes etapas: mezclar las células con una solución amortiguadora adecuada, separar materiales unidos de manera no específica de las células, y retirar el amortiguador junto con el desecho. Cada etapa se describe en mayor detalle más adelante.

10 Mezclar las células con amortiguador de lavado: En algunos ensayos, las células se inmovilizan en la superficie de un sustrato antes de lavarse. En dichos casos, el amortiguador de lavado se mezcla junto con la superficie de sustrato. En muchas otras realizaciones, las células que se deben lavar flotan libremente. El amortiguador de lavado se agrega a los sedimentos celulares o a la solución en la que flotan las células.

15 Separación de materiales unidos no de forma específica de las células: Es posible emplear cualquier cantidad de técnicas en la presente para reducir la unión no específica después del tratamiento de permeabilidad de la célula e hibridación de la sonda para fomentar la separación de las sondas unidas de forma no específica de las células y su disolución en el amortiguador de lavado. Estos incluyen aumentar la temperatura hasta algo por debajo de la temperatura de fusión de las sondas unidas de forma específica y emplear la agitación usando un agitador magnético o mecánico o perturbación con ondas sónicas o ultrasónicas. La agitación de la mezcla también se puede lograr mediante agitación del recipiente con un movimiento oscilante o de vórtice.

20 Retirar el amortiguador junto con los desechos: Es posible emplear cualquier método conveniente para separar y retirar el amortiguador de lavado y desechos de las células diana en la muestra. Por ejemplo, las células que flotan o los sustratos a los que se unen las células se separan del amortiguador y de los desechos mediante centrifugación. Después de la rotación, las células o los sustratos forman un sedimento en el fondo del recipiente. El amortiguador y los desechos se decantan de la parte superior.

25 Como otro ejemplo, la mezcla opcionalmente se transfiere a (o se forma en) un recipiente cuyo fondo está formado por una membrana porosa. El tamaño de poro de la membrana se selecciona para que sea más pequeño que las células diana o los sustratos a las que se unen las células pero lo suficientemente grandes para permitir que los desechos y otros materiales de desechos pasen a través de ellos. Para retirar los desechos, el aire o la presión del líquido se ajustan opcionalmente de manera que la presión sea superior dentro del recipiente que fuera de este, impulsando así el amortiguador y los desechos hacia el exterior del recipiente mientras la membrana conserva las células diana en el interior. Los desechos también se pueden retirar, por ejemplo, mediante filtración del amortiguador y los desechos a través de la membrana impulsada por la fuerza de gravedad o por fuerza centrífuga.

35 Como aun otro ejemplo, las células se pueden inmovilizar en la superficie de un sustrato grande, por ejemplo, un portaobjetos o el fondo de un recipiente, a través de fijación de células o unión por afinidad con proteínas en la superficie. El amortiguador y los desechos se pueden retirar directamente usando un vacío para decantarse desde la parte superior o dando vuelta el recipiente. Como aun otro ejemplo, las células se inmovilizan opcionalmente en perlas magnéticas, por ejemplo, mediante fijación química o unión por afinidad de proteínas en la superficie. Luego, las perlas se pueden inmovilizar en el recipiente al unir un campo magnético en el recipiente. El amortiguador y los desechos luego se pueden retirar directamente sin perder las células, de la misma manera que se describió en el ejemplo anterior. Como aun otro ejemplo, las células se inmovilizan opcionalmente en perlas que son más grandes que o comparables en tamaño a las células diana, por ejemplo, mediante fijación química o unión por afinidad de proteínas en la superficie. El amortiguador y los desechos luego se pueden retirar a través de una membrana porosa con un tamaño de poro más pequeño que las perlas. De manera alternativa, las perlas junto con las células se pueden separar del amortiguador y los desechos mediante gravedad o fuerza centrífuga, en donde esto último se retira de la capa superior. Como aun otro ejemplo, las sondas unidas de forma no específica dentro de las células se inducen para que migren fuera de las células mediante métodos electroforéticos mientras las sondas unidas de forma específica permanecen.

50 Como se mencionó anteriormente, el ciclo de lavado se completa al llevar a cabo cada una de las tres etapas anteriores, y el procedimiento de lavado se logra al realizar uno o más (por ejemplo, varios) de dichos ciclos de lavado. Se pueden usar distintas técnicas de lavado de amortiguadores, separación o remoción de desechos en distintos ciclos de lavado.

Detección

55 En la tecnología de la presente, las células diana que tienen partículas que generan señales (etiquetas) hibridadas específicamente a dianas de ácido nucleico en estas se pueden identificar a partir de una población heterogénea grande después de retirar las sondas unidas de forma no específica y otros desechos mediante lavado. Es posible emplear básicamente cualquier método conveniente para la detección e identificación.

En una realización, las células de suspensión se inmovilizan en un sustrato sólido después de la etapa de etiquetado o lavado que se describió anteriormente. La detección se puede lograr usando instrumentos basados en

microscopio. De manera específica, en los casos en los que la señal generada por las sondas sea luz quimioluminiscente, es posible usar un microscopio de imagenología con una cámara CCD o un microscopio de escaneo para convertir la señal lumínica en información digital. En los casos en los que la sonda transporta una etiqueta que emite una señal fluorescente, es posible usar imagenología fluorescente o un instrumento basado en microscopio de escaneo para la detección. Además, dado que las células diana, en general, son raras entre una población celular grande, se pueden usar algoritmos de descubrimiento de eventos automáticos para identificar y contabilizar de manera automática la cantidad de células diana en la población. Las células en suspensión se pueden inmovilizar en superficies sólidas mediante cualquier cantidad de técnicas. En una realización, se usa un recipiente con una superficie inferior plana grande para sostener la solución con las células suspendidas. Luego, el recipiente se centrifuga para impulsar a que las células que flotan se asienten en el fondo. Si la superficie es suficientemente grande en comparación con la concentración de las células en la solución, probablemente las células no se superpongan en la superficie inferior. En la mayoría de los casos, incluso si las células se superponen, las células diana no lo harán dado que son relativamente raras en una población grande. En otra realización, las células suspendidas se someten a CytoSpin en una superficie plana. Después de retirar los fluidos, las células se inmovilizan en la superficie mediante tensión superficial.

En determinadas realizaciones de la presente invención, las células flotan (en suspensión) o se inmovilizan en sustratos flotantes, tales como perlas, para que se puedan llevar a cabo procedimientos de predetección, tales como hibridación y lavado, de manera eficaz en solución. Existen varios métodos para detectar células diana raras fuera de una población celular flotante grande. El método preferido es utilizar un sistema de detección basado en el concepto de citometría de flujo, en donde las células flotantes o sustratos se ajustan y pasan frente a óptica de excitación y detección una a una. Las células diana se identifican mediante la señal óptica emitida por las sondas que se unen específicamente a las dianas de ácido nucleico en las células. La señal óptica, por ejemplo, puede ser luz luminiscente o luz fluorescente de una longitud de onda específica.

Ventajas

En resumen, la tecnología QMAGEX de la presente tiene diversos elementos exclusivos que permiten la detección de ácidos nucleicos multiplex en células individuales y la detección de células diana. Estos elementos incluyen lo siguiente.

Las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas dentro de las células se usan como marcadores para la identificación de CTC (u otros tipos celulares). En comparación con los marcadores basados en proteína, los ácidos nucleicos son más estables, están ampliamente disponibles y proporcionan una mejor relación de señal a ruido en la detección. Además, la técnica de detección se puede aplicar fácilmente a una gran variedad de tumores o incluso otras aplicaciones relacionadas con la identificación o clasificación de células. Como otra ventaja, las moléculas de ácido nucleico se miden de manera cuantificable a nivel de células individuales, en lugar de en una población celular mixta. Esta característica garantiza que la célula se conserve como unidad funcional clave en el sistema biológico para el estudio. En muchas aplicaciones que implican una población mixta de células, esta característica puede ser muy útil en la extracción de información útil y real del ensayo. (Por ejemplo, se puede identificar una CTC en función de la detección de la presencia o nivel de expresión de un conjunto de marcadores de ácido nucleico en la célula; la presencia o cantidad de copias de ácidos nucleicos adicionales en la célula puede proporcionar información adicional útil en el diagnóstico, predicción de resultados, o similar.)

Las células permanecen opcionalmente en suspensión o en sedimentos que pueden volver a suspenderse en todas las etapas del ensayo antes de la detección final. Esta característica mejora significativamente la cinética del ensayo, simplifica el proceso, potencia la capacidad de reproducción y mantiene a la célula en su estado pertinente más funcional. Por otro lado, los aspectos significativos de la invención, que incluyen la selección y el diseño de sondas, multiplexación, amplificación y etiquetado, se pueden aplicar directamente a la técnica de hibridación in situ para la detección y enumeración de células raras en muestras de tejido.

Se emplea opcionalmente un único enfoque de diseño de sonda de captura indirecto para lograr especificidad de hibridación diana excepcional, que genera una mejor relación de señal a ruido en la detección.

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

La tecnología inventada incorpora un esquema de amplificación de señales, que aumenta la sensibilidad de detección y permite la detección de células raras entre una gran cantidad de células normales con alta confianza.

La detección se puede implementar en FACS o instrumentos basados en citómetro de flujo o en plataformas basadas en microscopio. Esto último puede ser completamente automático y proporciona la rápida detección y el beneficio adicional de clasificar células identificadas para su estudio adicional, si se desea. Esta última plataforma está más ampliamente disponible y tiene el beneficio de permitir la identificación manual final mediante morfología.

Sistemas

En un aspecto, los sistemas y aparatos están configurados para llevar a cabo los procedimientos de los ensayos novedosos. El aparato o sistema comprende uno o más (y preferiblemente todos) de al menos los siguientes elementos.

5 Manipulación de fluidos: El aparato incluye opcionalmente un subsistema que puede agregar reactivos, y si lo requiere el ensayo, los fluidos de decantación del recipiente de muestra (por ejemplo, un recipiente retráctil o fijo, desechable o reutilizable, por ejemplo, un tubo de muestra, placa de múltiples pocillos, o similar). El subsistema puede estar basado en un sistema de transferencia de fluidos estilo pipeta en el que los distintos fluidos se manipulan con un cabezal de bomba con puntas desechables. Como un ejemplo alternativo, cada reactivo puede tener su propio canal de fluidos especializado.

10 Mezcla y agitación: El aparato incluye opcionalmente un dispositivo para mezclar distintos reactivos en la solución de muestra y fomentar la separación de cualquier material unido de forma no específica de las células. El dispositivo puede tener un mecanismo para introducir un movimiento de vórtice u oscilante al soporte del recipiente de muestra o para acoplar sonido o ultrasonido al recipiente. De manera alternativa, se puede colocar un agitador magnético en el recipiente de muestra y se puede impulsar mediante el campo magnético giratorio producido por un elemento instalado en un soporte del recipiente.

15 Control de temperatura: La temperatura de la muestra se puede controlar hasta un nivel superior a la temperatura ambiente al instalar un calentador y una sonda de temperatura en la cámara que sostiene el recipiente de muestra. Se puede usar un dispositivo peltier para controlar la temperatura hasta un nivel superior o inferior a la temperatura ambiente. El control de la temperatura es importante, por ejemplo, para la realización de los procedimientos de hibridación y lavado en los ensayos.

20 Separación de células y fluido de desechos: El aparato incluye opcionalmente un dispositivo que puede retirar el fluido de desechos de la mezcla de muestra a la vez que se conservan las células para el análisis adicional. El dispositivo puede comprender un recipiente de muestra que tiene una membrana porosa en su fondo. El tamaño del poro de la membrana es más pequeño que las células (o perlas en las cuales se inmovilizan las células) pero más grande que el material de desechos en la solución de mezcla. El espacio debajo de la membrana se puede sellar y conectar a una bomba de vacío. Como un ejemplo alternativo, el espacio sobre la membrana se puede sellar y conectar a una fuente de presión positiva. En una realización distinta, el dispositivo puede comprender una centrífuga. El recipiente con el fondo de membrana se carga en la centrífuga, que gira para impulsar la solución de desechos y salga a través de la membrana. En otra configuración de este dispositivo, el recipiente de muestra tiene un fondo sólido. Las células se depositan en el fondo después de la centrifugación, y la solución de desechos se decanta desde la parte superior mediante el subsistema de manipulación de fluidos descrito anteriormente.

25 Este dispositivo también puede realizar una función que prepara a la muestra para la lectura final. En las realizaciones en las que la lectura se realiza con microscopio, las células se depositan y unen comúnmente a una superficie plana. Una centrífuga en el dispositivo puede lograr esto si el fondo del recipiente es plano. En otro enfoque, una placa plana puede girar dentro de su plano, y el sistema puede emplear el dispositivo de manipulación de fluidos para colocar la solución que contiene las células en el centro del agente de rotación. Las células pueden girar de manera uniforme en la superficie de la placa.

30 Detección: El elemento de detección del aparato de la invención puede estar integrado con el resto del sistema o, de manera alternativa, puede separarse del resto de los subsistemas descritos anteriormente. (Por ejemplo, para las secciones FFPE, las etapas de ensayo se pueden realizar en una estación ISH automática, como la disponible comercialmente en Ventana Medical Systems Inc. o Leica Microsystems, la detección se puede realizar en un microscopio individual.) En una realización, el dispositivo de lectura se basa en un microscopio, que puede ser un microscopio de imagenología o escaneo. En otra realización, el dispositivo se basa en un microscopio de imagenología fluorescente o escaneo con múltiples longitudes de onda de excitación y lectura para distintas sondas. En una realización preferida, cuando las células se encuentran en suspensión, el dispositivo de lectura se basa en el citómetro de flujo. El enfoque de citometría es preferido debido a que puede leer células flotantes directamente fuera del fluido a múltiples longitudes de onda, por lo tanto, se mejora mucho la eficacia del ensayo.

35 Todos los elementos anteriores se pueden integrar en un instrumento. De manera alternativa, estos elementos se pueden incluir en distintos instrumentos, que funcionan juntos como un sistema para realizar el ensayo. La Figura 11 ilustra un ejemplo de realización particular de la configuración del instrumento. En esta configuración particular, la muestra se mantiene en un recipiente (tubo de prueba de muestra) con un fondo de membrana. Los reactivos se agregan desde la parte superior del tubo usando una bomba a través de una válvula de múltiples puertos. Los desechos se retiran del fondo mediante vacío. El soporte para el recipiente de muestra se fija en una mesa de agitación y se controla la temperatura del espacio alrededor de la muestra (zona con temperatura controlada) mediante el controlador de temperatura. El elemento de manipulación de fluidos puede introducir reactivos (reactivos de fijación y permeación, amortiguador de hibridación, conjuntos de sondas y amortiguador de lavado) en el tubo de muestra, retirar desechos en un recipiente de desechos y suministrar células a un citómetro de flujo para la detección.

En la presente se describe un sistema que comprende un soporte configurado para aceptar un recipiente de muestra; un controlador de temperatura configurado para mantener el recipiente de muestra a una temperatura seleccionada (por ejemplo, una temperatura seleccionada por un usuario del sistema o una temperatura previamente configurada, las distintas temperaturas se seleccionan opcionalmente para distintas etapas en un procedimiento del ensayo); un elemento de manipulación de fluidos conectado fluidamente al recipiente de muestra y configurado para agregar fluido y/o retirar fluido del recipiente de muestra; un elemento de mezcla configurado para mezclar (por ejemplo, agitar) los contenidos del recipiente de muestra; y un detector para la detección de una o más señales desde el interior de células individuales, en donde el detector se conecta opcionalmente de manera fluida al recipiente de muestra. Uno o más depósitos de fluido (por ejemplo, para reactivos de fijación o permeabilización, amortiguador de lavado, conjuntos de sondas y/o desechos) se conectan opcionalmente de forma fluida al recipiente de muestra.

Un sistema incluye opcionalmente una computadora. La computadora puede incluir el software apropiado para recibir instrucciones de usuario, ya sea en la forma de entrada del usuario en campos de parámetros configurados, por ejemplo, en un GUI, o en la forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo, preprogramadas para una variedad de operaciones específicas diferentes. Simplemente como un ejemplo, el software se puede preprogramar para una o más operaciones, tales como manipulación de muestras, manipulación de portaobjetos, desparafinización, desrreticulación cruzada, hibridación, lavado, etc. como se describe en la presente. El software convierte opcionalmente estas instrucciones en un lenguaje adecuado para controlar la operación de componentes del sistema (por ejemplo, para controlar un elemento y/o láser de manipulación de fluidos). La computadora también puede recibir datos de otros componentes del sistema, por ejemplo, de un detector, y puede interpretar los datos, proporcionarlos a un usuario en un formato legible por un humano, o usar los datos para iniciar operaciones adicionales, de conformidad con cualquier programación por parte del usuario.

Dianas de ácido nucleico

Como se mencionó, una diana de ácido nucleico puede ser básicamente cualquier ácido nucleico que se detecta de manera deseada en una célula. La elección de dianas obviamente dependerá de la aplicación deseada, por ejemplo, análisis de expresión, diagnóstico de enfermedad, clasificación en estadios o pronóstico, identificación o validación de dianas, análisis de vías, análisis de fármacos, estudios de eficacia del fármaco o cualquiera de muchas otras aplicaciones. Se han descrito grandes cantidades de dianas adecuadas en la técnica, y muchas más se pueden identificar usando técnicas estándar.

Para la detección de CTC, solamente como un ejemplo, se conocen diversas dianas de ácido nucleico adecuadas. Por ejemplo, un panel multiplex de marcadores para la detección de CTC podría incluir uno o más de los siguientes marcadores: epitelial específico de la célula (por ejemplo, CK19, Muc1, EpCAM), sanguíneo específico de la célula como selección negativa (por ejemplo, CD45), tumor de origen específico (por ejemplo, PSA, PSMA, HPN para cáncer de próstata y mam, mamB, her-2 para cáncer de mama), proliferante de potencial específico (por ejemplo, Ki-67, CEA, CA15-3), marcadores de apoptosis (por ejemplo, BCL-2, BCL-XL) y otros marcadores para cambios metastásicos, genéticos y epigenéticos. Como otro ejemplo, las dianas pueden incluir ARNm HOXB13 e IL17BR, cuya relación en el tumor primario ha demostrado predecir el resultado clínico de pacientes con cáncer de mama tratados con tamoxifeno (Ma et ál. (2004) "A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen" *Cancer Cell* 5(6):607-16 y Goetz et ál. (2006) "A Two-Gene Expression Ratio of Homeobox 13 and Interleukin-17B Receptor for Prediction of Recurrence and Survival in Women Receiving Adjuvant Tamoxifen" *Clin Cancer Res* 12:2080-2087). Ver también, por ejemplo, Gewanter, R. M., A. E. Katz, et ál. (2003) "RT-PCR for PSA as a prognostic factor for patients with clinically localized prostate cancer treated with radiotherapy" *Urology* 61 (5):967-71; Giatromanolaki et ál. (2004) "Assessment of highly angiogenic and disseminated in the peripheral blood disease in breast cancer patients predicts for resistance to adjuvant chemotherapy and early relapse" *Int J Cancer* 108(4):620-7; Halabi et ál. (2003) "Prognostic significance of reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate-specific antigen in metastatic prostate cancer: a nested study within CALGB 9583" *J Clin Oncol* 21(3):490-5; Hardingham et ál. (2000) "Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease" *Int J Cancer* 89(1):8-13; Hayes et ál. (2002) "Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer" *Int J Oncol* 21(5): 1111-7; Jotsuka, et ál. (2004) "Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer" *Surgery* 135(4):419-26; Allen-Mersh T et ál. (2003) "Colorectal cancer recurrence is predicted by RT-PCR detection of circulating cancer cells at 24 hours after primary excision" ASCO meeting, Chicago, mayo 2003; Shariat et ál. (2003) "Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy" *Cancer Res* 63(18):5874-8; Smith et ál. (2000) "Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques" *J Clin Oncol* 18(7): 1432-9; Stathopoulou et ál. (2002) "Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance" *J Clin Oncol* 20(16):3404-12; y Xenidis et ál. (2003) "Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer" *Ann Oncol* 14(6):849-55.

Una clase preferida de dianas de ácido nucleico que se detectará en los métodos de la presente es la implicada en

el cáncer. Cualquier ácido nucleico asociado al cáncer puede detectarse en los métodos de la invención, por ejemplo, aquellos que codifican factores de crecimiento de polipéptidos sobreexpresados o mutados (por ejemplo, sis), receptores de factores de crecimiento sobreexpresados o mutados (por ejemplo, erb-B1), proteínas de transducción de señales sobreexpresadas o mutadas tales como proteínas G (por ejemplo, Ras) tirosinas cinasas no receptores (por ejemplo, abl), proteínas reguladoras sobreexpresadas o mutadas (por ejemplo, myc, myb, jun, fos, etc.) y/o similares. En general, el cáncer a menudo puede unirse a moléculas de transducción de señales y productos oncogénicos correspondientes, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican Mos, Ras, Raf y Met; y activadores y supresores transcripcionales, por ejemplo, p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, y/o receptores nucleares. p53, denominado coloquialmente «policía molecular» de la célula, tiene una importancia particular, ya que aproximadamente 50 % de todos los cánceres conocidos pueden rastrearse a una o más lesiones genéticas en p53. Ejemplos de marcadores adicionales útiles para la detección de células de cáncer de mama incluyen, pero no se limitan a uPA (activador de plasminógeno tipo urocinasa), PAI-1 (inhibidor 1 del activador de plasminógeno), PAI-2 y/o uPAR (receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa). Otros ejemplos de marcadores adicionales incluyen, pero no se limitan a CK18, CK20, C-met, EGFR y ERCC1 (un marcador para la resistencia a cisplatino; los pacientes con tumores negativos para NSCLC y ERCC1 completamente extirpados son ayudados por la quimioterapia basada en cisplatino, a diferencia, los pacientes con tumores positivos para ERCC1 pueden soportar las toxicidades de la terapia con poco beneficio).

Tomando una clase de genes pertinentes al cáncer como ejemplo de descripción, muchos receptores de hormonas nucleares se han descrito en detalle y se han ejercitado los mecanismos mediante los cuales se pueden modificar estos receptores para otorgar actividad oncogénica. Por ejemplo, la base fisiológica y molecular de la acción de la hormona tiroidea se analiza en Yen (2001) "Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action" *Physiological Reviews* 81(3): 1097-1142, y las referencias allí mencionadas. Los receptores nucleares conocidos y caracterizados incluyen aquellos para glucocorticoides (GR), andrógenos (AR), mineralocorticoides (MR), progestinas (PR), estrógenos (ER), hormonas tiroideas (TR), vitamina D (VDR), retinoides (RAR y RXR) y los receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPAR) que se unen a eicosanoides. Los denominados «receptores nucleares huérfanos» también forman parte de la superfamilia del receptor nuclear, y son estructuralmente homólogos a receptores nucleares clásicos, tales como receptores de esteroides y tiroideas. Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de estos receptores, o formas oncogénicas de estos, se pueden detectar en los métodos de la invención. Aproximadamente el 40 % de todos los tratamientos farmacéuticos disponibles actualmente son agonistas o antagonistas de receptores nucleares y/u formas oncogénicas de estos, lo que enfatiza la importancia relativa de estos receptores (y sus ácidos nucleicos codificantes) como dianas para el análisis mediante los métodos de la invención.

Un ejemplo de clase de ácidos nucleicos diana es aquella de diagnóstico de cáncer de colon, por ejemplo, en muestras obtenidas de heces. El cáncer de colon es una enfermedad común que puede ser esporádica o heredada. La base molecular de varios patrones de cáncer de colon es conocida en detalle. En general, las mutaciones de la línea germinal son la base de los síndromes de cáncer de colon heredado, mientras que una acumulación de mutaciones somáticas es la base de cáncer de colon esporádico. En judíos asquenazi, una mutación que anteriormente se consideraba un polimorfismo puede provocar cáncer de colon familiar. Se han descrito las mutaciones de al menos tres clases distintas de genes en la etiología de cáncer de colon: oncogenes, genes supresores y genes de reparación de mal apareamientos. Un ejemplo de ácido nucleico codifica DCC (eliminada en cáncer de colon), una molécula de adhesión celular con homología a fibronectina. Una forma adicional de cáncer de colon es un gen dominante autosómico, hMSH2, que comprende una lesión. La poliposis adenomatosa familiar es otra forma de cáncer de colon con una lesión en el locus de MCC en el cromosoma número 5. Para detalles adicionales en el cáncer de colon, ver, Calvert et ál. (2002) "The Genetics of Colorectal Cancer" *Annals of Internal Medicine* 137 (7):603-612 y las referencias allí mencionadas. Para diversos cánceres de colon y marcadores de cánceres de colon que se pueden detectar en heces, ver, por ejemplo, Boland (2002) "Advances in Colorectal Cancer Screening: Molecular Basis for Stool-Based DNA Tests for Colorectal Cancer: A Primer for Clinicians" *Reviews In Gastroenterological Disorders* tomo 2, Sup. 1 y las referencias allí mencionadas. Como con otros cánceres, las mutaciones en diversos de otros genes que se correlacionan con el cáncer, tal como Ras y p53, son indicadores de diagnóstico útiles para el cáncer.

El cáncer de cuello uterino es otro ejemplo de diana para la detección, por ejemplo, mediante la detección de ácidos nucleicos que son diagnósticos de dicho cáncer en muestras obtenidas de secreciones vaginales. El cáncer de cuello uterino puede ser provocado por el papovavirus (por ejemplo, papilomavirus humano) y tiene dos oncogenes, E6 y E7. E6 se une a y retira p53 y E7 se une a y retira PRB. La pérdida de p53 y la acción no controlada de los factores de crecimiento E2F/DP sin la regulación de pRB es un mecanismo que conlleva cáncer de cuello uterino. E6 y/o E7 (por ejemplo, de cepas de HPV específicas, particularmente cepas de riesgo elevado, tales como HPV 16 y HPV 18) pueden usarse como marcadores para la detección de cáncer de cuello uterino. Otros marcadores útiles incluyen, pero no se limitan a factores implicados en el control del ciclo celular y/o replicación de ADN que se expresan de forma aberrante en cáncer de cuello uterino, tal como p16INK4a, topoisomerasa II alfa (TOP IIA) y mantenimiento de mini-cromosoma 2 (Mdm2).

Otro ejemplo de diana para la detección mediante los métodos de la invención es retinoblastoma, por ejemplo, en muestras obtenidas de lágrimas. El retinoblastoma es un tumor de los ojos que se genera a partir de la inactivación del gen pRB. Se ha descubierto la transmisión hereditaria cuando un progenitor tiene un gen pRB mutado (y, por

supuesto, la mutación somática puede provocar formas no heredables del cáncer).

La neurofibromatosis tipo 1 se puede detectar en los métodos de la invención. El gen NF1 está inactivado, que activa la actividad de GTPasa del oncogén ras. Si NF1 no está presente, ras es hiperactivo y provoca tumores neurales. Los métodos de la invención se pueden usar para detectar la neurofibromatosis tipo 1 en CSF o mediante extracción de muestras de tejido.

Se conocen muchas otras formas de cáncer y se pueden encontrar al detectar las lesiones genéticas asociadas usando los métodos de la invención. Los cánceres que se pueden detectar mediante la detección de lesiones apropiadas incluyen cánceres de los ganglios linfáticos, sangre, estómago, intestino, colon, testículos, páncreas, vejiga, cuello uterino, útero, piel y básicamente todos aquellos en los que existe una lesión genética conocida. Para una revisión del tema, ver, por ejemplo, The Molecular Basis of Human Cancer Coleman and Tsongalis (Eds) Humana Press; ISBN: 0896036340; 1° edición (agosto 2001).

De manera similar, los ácidos nucleicos de organismos patógenos o infecciosos pueden detectarse mediante los métodos de la invención, por ejemplo, para hongos infecciosos, por ejemplo, Aspergillus, o especie Candida; bacterias, particularmente E. coli, que sirve como modelo para las bacterias patógenas (y, por supuesto, determinadas cepas de las cuales son patógenas), así como bacterias médicamente importantes, tales como, Staphylococci (por ejemplo, aureus), o Streptococci (por ejemplo, pneumoniae); protozoarios tales como esporozoos (por ejemplo, Plasmodia), rizópodos (por ejemplo, Entamoeba) y flagelados (Trypanosoma, Leishmania, Trichomonas, Giardia, etc.); virus tales como (+) virus ARN (ejemplos de estos incluyen Poxvirus, por ejemplo, vaccinia; Picomavirus, por ejemplo, polio; Togavirus, por ejemplo, rubéola; Flavivirus, por ejemplo, HCV; y Coronavirus), (-) virus ARN (por ejemplo, Rhabdovirus, por ejemplo, YSV; Paramyxovirus, por ejemplo, RSV; Orthomyxovirus, por ejemplo, influenza; Bunyavirus; y Arenavirus), virus ADNcd (Reovirus, por ejemplo), virus ARN a ADN, es decir, Retrovirus, por ejemplo, HIV y HTLV, y determinados virus ADN a ARN, tal como Hepatitis B.

Como se mencionó anteriormente, los eventos de amplificación y eliminación génica se pueden detectar a nivel cromosómico usando los métodos de la invención, así como niveles de expresión alterados o anormales. Una clase preferida de dianas de ácido nucleico que se detectará en los métodos de la presente incluye oncogenes o genes supresores de tumores sujetos a dicha amplificación o eliminación. Ejemplos de dianas de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a integrina (por ejemplo, eliminación), tirosinas cinasas receptoras (RTK; por ejemplo, amplificación, mutación puntual, translocación o aumento de la expresión), NF1 (por ejemplo, eliminación o mutación puntual), Akt (por ejemplo, amplificación, mutación puntual o aumento de la expresión), PTEN (por ejemplo, eliminación o mutación puntual), EGFR (amplificación), c-met (amplificación), MDM2 (por ejemplo, amplificación), SOX (por ejemplo, amplificación), RAR (por ejemplo, amplificación), CDK2 (por ejemplo, amplificación o aumento de la expresión), Cyclin D (por ejemplo, amplificación o translocación), Cyclin E (por ejemplo, amplificación), Aurora A (por ejemplo, amplificación o aumento de la expresión), P53 (por ejemplo, eliminación o mutación puntual), NBS1 (por ejemplo, eliminación o mutación puntual), Gli (por ejemplo, amplificación o translocación), Myc (por ejemplo, amplificación o mutación puntual), HPV-E7 (por ejemplo, infección viral) y HPV-E6 (por ejemplo, infección viral).

Para las realizaciones en las cuales se usa una diana de ácido nucleico como referencia, los ácidos nucleicos de referencia adecuados se han descrito de manera similar en la técnica o se pueden determinar. Por ejemplo, diversos genes cuya cantidad de copias se mantiene de forma estable en varias células tumorales se conocen en la técnica. Los genes constitutivos cuyas transcripciones pueden servir como referencia en los análisis de expresión génica incluyen, por ejemplo, 18S rRNA, 28S rRNA, GAPD, ACTB y PPIB. Se han descrito ácidos nucleicos similares adicionales en la técnica y se pueden adaptar a la práctica de la presente invención.

Etiquetas

Se conocen diversas etiquetas en la técnica y se pueden adaptar a la práctica de la presente invención. Por ejemplo, se han descrito etiquetas luminiscentes y etiquetas de dispersión de luz (por ejemplo, partículas de oro coloidal). Ver, por ejemplo, Csaki et ál. (2002) "Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics" Expert Rev Mol Diagn 2:187-93.

Como otro ejemplo, se conocen en la técnica diversas etiquetas fluorescentes, que incluyen, pero no se limitan a fluoróforos hidrofóbicos (por ejemplo, ficoeritrina, rodamina, Alexa Fluor 488 y fluoresceína), proteína fluorescente verde (GFP) y variantes de estos (por ejemplo, proteína fluorescente cian y proteína fluorescente amarilla) y puntos cuánticos. Ver, por ejemplo, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, décima edición o edición web (2006) de Invitrogen (disponible en la Internet en probes (punto) invitrogen (punto) com/handbook), para descripciones de fluoróforos que emiten a varias longitudes de onda distintas (que incluyen conjugados en tándem de fluoróforos que pueden facilitar la excitación y detección simultánea de múltiples especies etiquetadas). Para el uso de puntos cuánticos como etiquetas para biomoléculas, ver, por ejemplo, Dubertret et ál. (2002) Science 298:1759; Nature Biotechnology (2003) 21:41-46; y Nature Biotechnology (2003) 21:47-51.

Las etiquetas se pueden introducir a las moléculas, por ejemplo, polinucleótidos, durante la síntesis o mediante reacciones posintéticas mediante técnicas establecidas en la técnica. Por ejemplo, los kits para polinucleótidos etiquetados fluorescentemente con varios fluoróforos están disponibles en Molecular Probes, Inc. (www (punto)

molecularprobes (punto) com), y fosforamiditas que contienen fluoróforo para su uso en la síntesis de ácido nucleico están disponibles comercialmente. De manera similar, las señales de las etiquetas (por ejemplo, absorción y/o emisión fluorescente de una etiqueta fluorescente) se pueden detectar básicamente mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la detección multicolor y similar es conocida en la técnica. Los instrumentos para la detección de etiquetas son asimismo conocidos y están ampliamente disponibles, por ejemplo, escáneres, microscopios, citómetros de flujo, etc. Por ejemplo, los citómetros de flujo están ampliamente disponibles, por ejemplo, en Becton-Dickinson (www (punto) bd (punto) com) y Beckman Coulter (www (punto) beckman (punto) com).

Técnicas biológicas moleculares

En la práctica de la presente invención, se usan opcionalmente muchas técnicas convencionales en biología molecular, microbiología y tecnología de ADN recombinante. Estas técnicas son conocidas y se explican en, por ejemplo, Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology tomo 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA; Sambrook et ál., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3rd Ed.), tomo 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000 y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et ál., eds., Current Protocols, una sociedad colectiva entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado hasta 2008). Otras referencias útiles, por ejemplo, para el aislamiento y cultivo celular (por ejemplo, para el aislamiento de ácidos nucleicos posterior) incluyen Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias mencionadas allí; Payne et ál. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, NY; Gamburg and Phillips (Eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg Nueva York) y Atlas and Parks (Eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Producción de polinucleótidos

Los métodos para producir ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante amplificación in vitro, purificación a partir de células o síntesis química), métodos para la manipulación de ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante digestión enzimática por restricción, ligación, etc.) y varios vectores, líneas celulares y similares útiles en la manipulación y producción de ácidos nucleicos se describen en las referencias anteriores. Además, los métodos para producir polinucleótidos ramificados (por ejemplo, multímeros de amplificación) se describen en USPN 5,635,352, USPN 5,124,246, USPN 5,710,264 y USPN 5,849,481, así como en otras referencias mencionadas anteriormente.

Además, básicamente cualquier polinucleótido (que incluye, por ejemplo, los polinucleótidos etiquetados o biotinilados) pueden solicitarse de manera personalizada o estándar de diversas fuentes comerciales, tales como, The Midland Certified Reagent Company (www (punto) mrc (punto) com), The Great American Gene Company (www (punto) genco (punto) com), ExpressGen Inc. (www (punto) expressgen (punto) com), Qiagen (oligos (punto) qiagen (punto) com) y muchos otros.

Una etiqueta, biotina u otro resto puede introducirse opcionalmente en un polinucleótido, ya sea durante o después de la síntesis. Por ejemplo, una fosforamidita de biotina puede incorporarse durante la síntesis química de un polinucleótido. De manera alternativa, cualquier ácido nucleico puede biotinilarse usando técnicas conocidas en la técnica; los reactivos adecuados están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Pierce Biotechnology (www (punto) piercenet (punto) com). De manera similar, cualquier ácido nucleico puede etiquetarse fluorescentemente, por ejemplo, usando los kits disponibles comercialmente, tales como aquellos de Molecular Probes, Inc. (www (punto) molecularprobes (punto) com) o Pierce Biotechnology (www (punto) piercenet (punto) com) o mediante la incorporación de una fosforamidita etiquetada fluorescentemente durante la síntesis química de un polinucleótido.

Referencias:

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

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

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

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

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

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

- Mocellin S et al (2004) Molecular detection of circulating tumor cells in an independent prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanoma. *Int J Cáncer* 111:741-745
- Cristofanilli M. et ál., (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cáncer. *N Engl J Med.* 19 Ago 2004;351 (8):781-91.
- 5 Ito S et ál., (2002) Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cáncer patients during surgery with the real-time RT-PCR on a Light Cycler, *Cáncer Letters*, 183:195-203.
- Hicks DG et ál., In situ hybridization in the pathology laboratory: General principles, automation, and emerging research applications for tissue-based studies of gene expression. *J Mol Histol.* Ago 2004;35(6):595-601.
- 10 Herzenberg LA et ál. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* Oct 2002;48(10):1819-27.
- Timm EA Jr et ál. Amplification and detection of a Y-chromosome DNA sequence by fluorescence in situ polymerase chain reaction and flow cytometry using cells in suspensión. *Cytometry.* 15 sept 1995;22(3):250-5.
- Bauman JG, Bentvelzen P. Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent in situ hybridization. *Cytometry.* Nov 1988;9(6):517-24.
- 15 Timm EA Jr, Stewart CC. Fluorescent in situ hybridization en suspensión (FISHES) using digoxigenin-labeled probes and flow cytometry. *Biotechniques.* Mar 1992;12(3):362-7.
- Bains MA Flow cytometric quantitation of sequence-specific mRNA in hemopoietic cell suspensions by primer-induced in situ (PRINS) fluorescent nucleotide labeling. *Exp Cell Res.* Sept 1993;208(1):321-6.
- 20 Patterson BK Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven in situ hybridization and flow cytometry. *Science.* 14 mayo 1993;260(5110):976-9.
- Rufer N Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol.* Ago 1998;16(8):743-7.
- Hultdin M Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 15 ago 1998;26(16):3651-6.
- 25 Fava TA, et al Ectopic expression of guanylyl cyclase C in CD34+ progenitor cells in peripheral blood. *J Clin Oncol.* 1 oct 2001; 19(19):3951-9.
- Kosman D, Mizutani CM, Lemons D, Cox WG, McGinnis W, Bier E. Multiplex detection of RNA expression in *Drosophila* embryos. *Science.* 6 ago 2004;305(5685):846.
- 30 Player AN, Shen LP, Kenny D, Antao VP, Kolberg JA. Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* Mayo 2001;49(5):603-12.
- Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science.* 26 jul 1996;273(5274):494-7.
- 35 Larsson C, Koch J, Nygren A, Janssen G, Raap AK, Landegren U, Nilsson M. In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *NatMethods.* Dic 2004;1(3):227-32. Epub 18 nov 2004.
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V.E., Kem, S.E., Hruban, R.H., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Gene expression profiles in normal and cáncer cells. *Science* (Nueva York, NY 276, 1268-1272.
- 40 Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high- sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1986 83:2934-2938.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de ácidos nucleicos en células individuales

- 45 A continuación, se establece una serie de experimentos que demuestran la detección en células de ácidos nucleicos. Los resultados demuestran, por ejemplo, que cuando se tiñen las células en un sustrato vítreo con QMAGEX podemos obtener una señal muy específica con una sensibilidad de detección de una única molécula de ARNm. Además, podemos lograr la tinción de múltiples ARNm al mismo tiempo usando una combinación de distintas sondas diana y amplificadores. Estos resultados demuestran además la viabilidad de la detección de células cancerosas que exhiben aumento transcripcional dentro de una población de células con expresión génica normal. Los resultados también demuestran tinción de células en suspensión y su identificación usando citometría

de flujo, lo que elimina la necesidad de un soporte sólido para las células y permite la rápida detección de las células teñidas. Estos resultados demuestran además la capacidad de detectar células que exhiben aumento transcripcional a partir de aquellas con niveles basales bajos de expresión de ARNm de manera rápida usando citometría de flujo.

Resumen del ensayo

5 Hemos desarrollado un ensayo para la detección de múltiples transcripciones de ARN in situ en células individuales en una población celular grande, que hemos denominado QMAGEX. El ensayo se puede realizar, por ejemplo, en células unidas a un sustrato vítreo y examinadas en un microscopio fluorescente o en células en suspensión y analizadas con un citómetro de flujo. Este ensayo es análogo, en algunos aspectos, a ISH/FISH ARN tradicional pero posee las siguientes características exclusivas: 1) tiene la sensibilidad de detectar una única transcripción de ARNm; 2) es fácil de llevar a cabo multiplex in situ para la detección simultánea de marcadores que pueden estar correlacionados con la morfología celular; 3) puede proporcionar una tinción de control interno de un gen constitutivo a través de su capacidad multiplex para determinar la integridad del ARN y la calidad del ensayo (importante para la aprobación reguladora); y 4) las señales de QMAGEX son semicuantitativas y/o cuantitativas.

15 El procedimiento del ensayo básico (Figura 1) se puede realizar durante un día y, en general, incluye las siguientes etapas. Después de fijarse y permeabilizarse, las células en el sustrato o en suspensión se hibridan con la siguiente serie de sondas de oligonucleótidos. En primer lugar, se hibrida un conjunto de sondas de captura con el ARN diana dentro de las células. A continuación, las moléculas preamplificadoras (PreAMP) se hibridan con las sondas de captura, lo que proporciona un puente para la hibridación de moléculas amplificadoras (AMP). Por último, la amplificación de la señal se logra mediante la unión de, por ejemplo, hasta 20 AMP con cada PreAMP, y 20 sondas de etiqueta (LP) con cada AMP, dando un total de 400 etiquetas fluorescentes o etiquetas de fosfatasa alcalina (AP) con cada sonda diana. (Cabe destacar que la intensidad de la señal se puede potenciar aun más mediante la inclusión de más de una etiqueta en cada LP; simplemente como un ejemplo, al conjugar hasta tres moléculas fluorescentes por LP en lugar de una molécula fluorescente por LP.) En el caso en el que se usan LP conjugadas con AP junto con el sustrato Fast Red, se potencia la amplificación de señales aun más debido al depósito de precipitado fluorescente rojo en la cercanía del ácido nucleico diana. Se detectan señales, por ejemplo, con un microscopio fluorescente regular con filtros apropiados o con un citómetro de flujo multicolor.

25 La hibridación no específica se puede evitar o minimizar mediante el concepto de «hibridación cooperativa» (para obtener detalles adicionales, ver Flagella et ál. (2006) "A multiplex branched DNA assay for parallel quantitative gene expression profiling" *Anal Biochem.* 352(1):50-60 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0015188 titulada "Multiplex detection of nucleic acids" de Luo et ál.). La hibridación no específica se puede evitar o minimizar, por ejemplo, mediante el diseño de conjuntos de sondas dirigidas a una secuencia de ARNm específica usando un diseño de sonda «Z» doble. Las sondas «Z» dobles diana se analizan previamente contra la base de datos GenBank para garantizar la hibridación cruzada mínima con secuencias de ácido nucleico no previstas. En el diseño «Z» doble, dos sondas cercanas contienen una secuencia de hibridación de la diana, por ejemplo, 20 a 30 bases de longitud con una Tm significativamente superior a la temperatura del ensayo, y una secuencia de hibridación de PreAMP, por ejemplo, solamente 14 bases de longitud con una Tm bastante por debajo de la temperatura del ensayo (Paneles C-D de la Figura 9). Como resultado, una única sonda de captura puede unirse al ARN diana fuerte y establemente durante la hibridación, pero se unirá al PreAMP débil e inestablemente debido a la región de 14 pares de bases de homología con una Tm bien por debajo de la temperatura del ensayo. Sin embargo, cuando hay dos sondas de captura presentes en las posiciones cercanas, la potencia de hibridación combinada, por ejemplo, de 28 pares de bases complementarios, sostiene el PreAMP fuerte y establemente a la temperatura del ensayo, lo que permite que ocurra la amplificación de señales. Dicho diseño «Z» doble permite la especificidad de alta detección y simplifica el diseño de sondas para la detección simultánea de múltiples dianas.

45 Se han analizado dos amplificadores de señales en el ensayo, uno con 400 veces (400X AMP1) de amplificación y otro con 16 veces (16X AMP2) de amplificación. El AMP1 400X se compone de sitio de unión de 20 AMP por PreAMP y 20 AP o sitios de unión a LP conjugada fluorescente por molécula de AMP para proporcionar 400 moléculas de etiquetado por par de sondas de captura (20x20=400). El AMP2 16X se compone de sitios de unión de 4 AMP por PreAMP y 4 AP o sitios de unión a LP conjugada fluorescente por AMP para producir 16 moléculas de etiquetado por par de sondas de captura (4x4=16). Se demostró experimentalmente que los dos sistemas de amplificación no presentan reactividad cruzada entre sí.

Detección en célula de ARN 18S

55 En un experimento inicial, las sondas de captura 18S (sondas de captura complementarias a ARN 18S) junto con 16X AMP2 se usaron en células HeLa desarrolladas en cubreobjetos. El objetivo de este esfuerzo inicial fue identificar una condición de ensayo que produce relación de señal a fondo máxima. Como se describirá más adelante, hemos logrado una relación de señal a fondo suficiente para la detección de ARNm de una sola copia. Para comprender la magnitud del potenciamiento de la señal mediante los amplificadores, llevamos a cabo experimentos paralelos en los cuales se usó el mismo conjunto de sondas de captura 18S para analizar ARN 18S en células HeLa. Se amplificó un conjunto de sondas de captura mediante 16X AMP2/Alexa 488-LP, mientras que el otro conjunto se analizó con un amplificador diseñado para tener solamente un sitio de unión de PreAMP/AMP y un Alexa 488-LP (1X AMP3). Al configurar el tiempo de exposición de cámara constante, captamos la señal 18S en

células etiquetadas con 16X AMP2 (Panel A de la Figura 12) y 1X AMP3 (Panel B de la Figura 12). Observamos de forma reproducible una señal 18S superior en las células etiquetadas con 16X AMP2 que con 1X AMP1, lo que sugiere que la amplificación de señales es necesaria para generar una relación de señal a fondo más alta. Para confirmar la especificidad del diseño de sonda de captura, usamos un conjunto de sondas dirigidas a la cadena antisentido de la secuencia de intrones 18S, y mostró una señal de fondo baja a nula (Panel C de la Figura 12). También hemos descubierto que la señal 18S se retira por completo cuando las células se tratan previamente con ARNasa o cuando las células se incuban sin un conjunto de sondas de captura o solamente con la secuencia final complementaria al PreAMP (no se muestran los datos). Por lo tanto, estos resultados indican que la señal fluorescente que observamos es específica en el etiquetado de ARN 18S. El diseño de la sonda de captura «Z» doble usada en QMAGEX mejora mucho la especificidad del ensayo. En los experimentos en los cuales se usó una mitad o la otra del conjunto de sondas «Z» dobles, la señal se reduce mucho en comparación con la señal cuando se usa el conjunto de sondas completo (Paneles D y E de la Figura 12 vs Panel A). En función de los resultados anteriores, concluimos que QMAGEX cumple con nuestro principio de diseño previsto y el ensayo es el primero de su tipo en la amplificación de señales simultánea (PreAMP/AMP) y reducción de fondo (diseño Z doble) para lograr una señal elevada y gran especificidad.

Ensayo QMAGEX doble

Para explorar su potencial para la detección in situ de transcripciones de ARN de bajas copias y su capacidad de detección multiplex, desarrollamos un ensayo QMAGEX multiplex usando 18S y Her-2 como genes de modelo. HeLa y SKBR3 se etiquetan con DAPI para facilitar la identificación de los núcleos (azul). Se etiquetó ARNm Her-2 con 400X AMP1/Alexa 488-LP (verde), mientras que ARN 18S se etiquetó con 16X AMP2/Alexa 555-LP (rojo). La expresión elevada de 18S en HeLa (Paneles A y C de la Figura 13) y SKBR3 (Paneles B y D de la Figura 13) dio como resultado un patrón de tinción ubicuo alrededor de todas las células. Cuando se etiquetó ARNm Her-2 (verde), las señales parecieron ser puntos fluorescentes puntuados con células SKBR3 que muestran una mayor cantidad de puntos por célula (Panel B de la Figura 13) que HeLa (Panel A de la Figura 13), lo que concuerda con el hecho de que SKBR3 es una línea celular de cáncer de mama con amplificación génica de HER2, mientras que HeLa no presenta amplificación de HER2. Dado que un conjunto de sondas de control dirigidas a la cadena antisentido de la secuencia de intrones Her-2 no produjo puntos fluorescentes verdes en ninguna célula (Paneles C y D de la Figura 13), concluimos que las sondas de captura diseñadas para ARNm Her-2 son específicas en la detección de transcripciones de ARNm Her-2. También observamos la variación de puntos de ARN en células HeLa individuales. Considerando el mismo nivel relativo de tinción de 18S (un gen constitutivo) en todas las células HeLa, creemos que la variación en la cantidad de puntos observada en HeLa probablemente es una propiedad intrínseca de la expresión génica, en lugar de variabilidad del ensayo, y concuerda con las observaciones previas en la expresión estocástica de las transcripciones de ARNm (por ejemplo, analizado por Shav-Tal et ál. (2004) "Imaging gene expression in single living cells" *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(10):855-61). Por lo tanto, hemos demostrado usando un dúplex Her-2/18S que el ensayo QMAGEX se puede usar para detectar dos transcripciones de ARN de manera simultánea y que las señales relativas se pueden usar para comparar la expresión génica.

Detección de ARNm de una sola copia

El patrón de expresión puntuado de Her-2 en células HeLa y SKBR3 detectadas usando QMAGEX sugiere que cada punto fluorescente es un ARNm; sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que cada punto representa dos o más ARNm en cercanía entre sí. Diseñamos dos experimentos para distinguir entre estas dos posibilidades. El primer experimento utilizó QuantiGene 2.0, un ensayo cuantitativo establecido, para comparar la cantidad de copias promedio de transcripciones por célula con la cantidad de puntos fluorescentes observados en QMAGEX. Etiquetamos ARNm Her-2 en células HeLa con sondas de captura diseñadas para el gen Her-2 seguido por 400XAMP1/Alexa488-LP o 400XAMP1/AP-LP y reacción con sustrato Fast Red para garantizar la detección sensible y reproducible de todos los puntos de ARN. En ambos ensayos, se seleccionaron 200 células de manera aleatoria. Se contabilizó la cantidad de puntos fluorescentes en cada célula y se calculó el promedio de puntos por célula. El histograma de puntos fluorescentes por célula mediante ambos esquemas de etiquetado (Figura 14) demostró una distribución estocástica similar con un valor medio a 3 copias por célula y un valor promedio de 3.2-3.4 copias por célula. La cantidad similar de puntos observada usando fluorescencia y Fast Red indicó que la amplificación de señales adicional generada por el sustrato Fast Red no es necesaria para dilucidar todos los ARN presentes en las células. Usando el ensayo QuantiGene 2.0, se analizó el mismo lote de células HeLa y demostró un promedio de ~5 transcripciones de ARNm Her-2 por célula, lo que se aproxima a nuestros resultados usando el ensayo QMAGEX (Tabla 1). Para confirmar aun más estos resultados, diseñamos un segundo experimento en el cual medimos la intensidad fluorescente de cada punto para ARNm Her-2 y la comparamos con la intensidad fluorescente de cada punto en el ADN genómico HER2. En este experimento, se llevaron a cabo ensayos QMAGEX de ARN y ADN en paralelo en el mismo lote de células HeLa usando las mismas sondas de captura. Con un tiempo de exposición de cámara constante, se tomaron imágenes de ensayos QMAGEX ADN y ARN. Se utilizó el programa CellProfiler (www.cellprofiler.org) para medir la intensidad fluorescente de cada punto. Dado que usamos el mismo conjunto de sondas para FISH ARN y ADN, sería de esperar una distribución similar de intensidad fluorescente si el ARN se mide a una resolución de una sola copia. Esto se debe a que cada punto fluorescente en FISH ADN representa una única copia génica. En nuestro análisis de distribución de intensidad fluorescente (no se muestran los datos), el intervalo de intensidad fluorescente de puntos de ARN no supera la intensidad fluorescente de cada punto de ADN, lo que confirma que cada punto de ARN realmente representa un ARNm de una sola copia. La

detección in situ de ARNm de una sola copia mediante microscopio fluorescente de rutina es un logro principal dado que esto no se ha realizado antes. Los ensayos ISH/FISH tradicionales solamente presentan una sensibilidad de detección de aproximadamente 50 copias por célula, que excluye el 95 % de los genes que se expresan a un nivel inferior a 50 transcripciones por célula (Zhang et ál. (1997) "Gene expression profiles in normal and cancer cells" Science 276(5316): 1268-72).

Tabla 1. Promedio de copias de ARNm/célula determinadas mediante QG2.0.

Genes	HeLa		SKBR3
	Control	Inducido	
Her-2	~5	NA	~100
IL-6	~2	~5	NA
IL-8	~1	~275	NA

Determinación de cambios en la expresión génica en células individuales

La inducción de la expresión génica de citocinas en células HeLa luego del tratamiento con PMA es un modelo clásico para la validación de las tecnologías de determinación de perfiles de expresión. Se ha demostrado que ARNm IL-6 e IL-8 se expresan en niveles muy bajos en células HeLa en reposo, pero se inducen de manera significativa luego del tratamiento con PMA (por ejemplo, Zhang et ál. (2005) "Small interfering RNA and gene expression analysis using a multiplex branched DNA assay without RNA purification" J Biomol Screen. 10(6):549-56). Usando QuantiGene 2.0, hemos determinado que, en promedio, hay solamente aproximadamente 1 a 2 copias de ARNm IL-8 e IL-6 por célula en células HeLa en reposo y luego de la inducción con PMA de IL-8 e IL-6 aumenta hasta ~275 copias y ~5 copias por célula, respectivamente (Tabla 1). Dado que las tecnologías existentes (por ejemplo, micromatriz, qRT-PCR, QuantiGene 2.0) miden la expresión génica en ARN purificado o lisados celulares, la medición representa una respuesta promedio de grupos de células en la muestra. Por el contrario, QMAGEX ofrece una única oportunidad para determinar la expresión de ARNm en células individuales en respuesta al tratamiento con PMA. Usando 400X AMP1 junto con Alexa 488-sonda de etiqueta, hemos determinado la expresión para ARNm IL-6 e IL-8 en células HeLa en reposo (Paneles A y B de la Figura 15) y tratadas con PMA (Paneles C y D de la Figura 15) a nivel de células individuales. Si bien se observan niveles muy bajos de expresión de ARNm IL-6 e IL-8 en células HeLa en reposo, se observa inducción significativa de IL-6 y nivel de inducción extremadamente elevado de IL-8 en algunas, aunque no en todas las células HeLa tratadas con PMA. Por lo tanto, si bien la expresión de IL-6 e IL-8 medida en células individuales mediante el ensayo QMAGEX concuerda con la respuesta de expresión promedio obtenida mediante QuantiGene 2.0, existe una variación notoria en la respuesta de células individuales dado que algunas células muestran niveles extremadamente elevados de inducción, mientras que otras células permanecen incambiables (Paneles C y D de la Figura 15). La variación notoria en el perfil de expresión de células individuales enfatiza la heterogeneidad en la respuesta de células individuales al tratamiento con PMA, incluso con una supuesta línea celular homogénea. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio para observar la respuesta de inducción de la expresión génica natural a nivel de células individuales. La respuesta de expresión heterogénea observada enfatiza el valor de estudiar la biología de células individuales para las cuales QMAGEX puede ser una herramienta valiosa.

Detección de células cancerosas en poblaciones celulares mixtas

Para determinar la viabilidad de QMAGEX en la detección de CTC, mezclamos células de cáncer de mama en células Jurkat (origen de linfocitos T) o WBC, y evaluamos la capacidad de QMAGEX de distinguir las células de cáncer de mama de células Jurkat o WBC. Por ejemplo, mezclamos células SKBR3 con células Jurkat en una relación 1:50, las cultivamos durante un día, y detectamos la expresión de ARNm del marcador de células cancerosas común CK19 en las células mixtas mediante QMAGEX. Usando las sondas de captura dirigidas a CK19 junto con 400X AMP1/AP-LP y el sustrato Fast Red, se identificaron células SKBR3 según su expresión elevada de CK19 entre células Jurkat negativas para CK19 (Panel A de la Figura 16). También hemos añadido células de cáncer de mama BT474 en células sanguíneas purificadas con Ficoll en una relación 1:1.000, sometimos a cytopspin las células en un portaobjetos, y realizamos QMAGEX con sondas de captura dirigidas a CK19 junto con 400X AMP1/AP-LP y sustrato Fast Red. De manera similar a las células mixtas Jurkat/SKBR3, 1 por 1000 células se etiquetaron con CK19 (Panel B de la Figura 16), lo que sugiere que el ensayo QMAGEX se debería usar para

diferenciar las células en función del nivel de expresión génica diferencial. Además de CK19, también mostramos que QMAGEX con la sonda de captura Her-2 es eficaz en la identificación de células SKBR3 entre HeLa, Jurkat y WBC (no se muestran los datos). Por lo tanto, estos resultados prueban la viabilidad del uso del ensayo QMAGEX para la detección de CTC en muestras de sangre de pacientes.

5 Ensayo QMAGEX basado en citometría de flujo (FC-QMAGEX)

Actualmente, la detección de CTC en muestras de sangre de pacientes requiere la etapa de enriquecimiento de CTC (por ejemplo, separación inmunomagnética) seguido de tinción y escaneo de una gran población de células en un sustrato vítreo para la identificación de CTC raras teñidas de manera positiva. El enriquecimiento, depósito de células en un sustrato vítreo, y escaneo usando un microscopio digital automático son procedimientos difíciles y que insumen tiempo. Para evitar estas etapas, analizamos la capacidad del ensayo QMAGEX de teñir las células en suspensión y para identificar las células teñidas de forma positiva mediante citometría de flujo.

Para el ensayo FC-QMAGEX, en primer lugar, tripsinizamos células HeLa cultivadas en un sustrato en células en suspensión, y luego hibridamos las células con sondas de captura 18S seguido de amplificación de señales con 16X AMP2 o 1X AMP3 y etiquetado usando Alexa488. La tinción positiva se identificó en las células HeLa en suspensión mediante microscopio fluorescente y se comparó con las células de control no hibridadas con las sondas de captura o amplificadores de señales (Paneles A-C de la Figura 17). El 16X AMP2 presentó una tinción fluorescente más fuerte en células HeLa en suspensión redondeadas que 1X AMP3, lo que concuerda con los resultados anteriores en las células cultivadas en sustrato (Paneles A-B de la Figura 12). A continuación, determinamos la sensibilidad de la citometría de flujo (LSRII, BD Biosciences) para detectar y cuantificar la expresión de ARN 18S en células individuales con 50.000 células contabilizadas por ensayo. El histograma de citometría de flujo (Panel D de la Figura 17) demostró la detección de 1X AMP3 con señales ~ 100 veces por encima de la referencia, lo que demuestra un nivel elevado de sensibilidad de detección. La detección de las células con el 16X AMP2 produjo un aumento de aproximadamente 10 veces en la intensidad de la señal con respecto a la observada con el 1X AMP3. Dado que la señal de 16X AMP2 se encuentra en el punto de saturación en la escala de detección, el aumento de 10 veces en la señal con respecto al 1X AMP3 es probablemente una subestimación de la amplificación de señales real alcanzada. Para comprender la contribución de la fluorescencia de fondo en la citometría de flujo, comparamos la fluorescencia de fondo de 1) células hibridadas sin sondas de captura y sin amplificador de señales o sonda de etiqueta (una medida de la autofluorescencia celular); 2) células hibridadas sin sondas de captura, pero con 400X AMP1 y sonda de etiqueta Alexa488; o 3) células hibridadas con sondas de captura de intrón 18S seguida de 400X AMP1 y sonda de etiqueta Alexa488. Observamos una pequeña diferencia en la fluorescencia de fondo (no se muestran los datos) medida, lo que sugiere que la referencia está contribuida principalmente por la autofluorescencia celular. Este resultado demuestra nuevamente el valor del diseño de «Z» doble en la reducción de la referencia relacionada con la hibridación no específica, que había sido varias veces mayor que la autofluorescencia celular (por ejemplo, Yu et ál. (1991) "Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry" *Nucleic Acids Res.* 20(1):83-8). Este estudio demuestra que el etiquetado y la detección específicos de ARN 18S se puede lograr para células HeLa en suspensión y el nivel de ARN 18S se puede medir de manera cuantitativa mediante citometría de flujo.

Analizamos un segundo marcador, CK19, en la línea celular MCF7. También pudimos detectar una señal positiva fuerte con respecto a la referencia de ~400 veces (no se muestran los datos). Estos resultados demuestran la viabilidad de la realización del ensayo QMAGEX en suspensión, lo que evita la necesidad de un soporte sólido y aumenta la velocidad de escaneo hasta más de 20.000 células por segundo, superando ampliamente al microscopio digital automático. Además, la capacidad de un citómetro de flujo de detectar una amplificación 1X indica que podemos detectar transcripciones con muy baja expresión y distinguirlas de los ARNm con mayor expresión.

Detección de transcripciones de ARNm con bajas copias usando FC-QMAGEX

Uno de los sellos distintivos de la transformación celular es el aumento de los genes específicos del cáncer. Este aumento en la cantidad de transcripciones puede ser el resultado de los cambios genéticos, tales como la amplificación génica, como es el caso con un subconjunto de cánceres de mama distinguidos por un aumento de la cantidad de copias del gen HER2. Para determinar si nuestro ensayo QMAGEX basado en citometría de flujo podría distinguir estas células transformadas de una población general que expresa solamente niveles basales bajos de ARNm, nuevamente utilizamos la línea celular SKBR3, que contiene una amplificación del gen HER2, y comparamos los niveles de expresión de ARNm Her-2 con aquellos observados en la línea celular HeLa no amplificada. Las células SKBR3 y HeLa se hibridaron con las sondas de captura de Her2, se amplificaron con 400X AMP1, y etiquetaron con Alexa488. Las células no hibridadas se utilizaron como control negativo para la fluorescencia de fondo. El histograma de citometría de flujo demostró un aumento de la intensidad de la señal tanto para células HeLa como SKBR3 con respecto a la referencia (Figura 18). Dado que las células HeLa demostraron un nivel de expresión promedio de 5 copias de ARNm por células en QuantiGene 2.0 y un promedio de 3 copias por célula en QMAGEX, estos resultados sugieren que el ensayo FC-QMAGEX ya es muy sensible, con sensibilidad de detección por debajo de 5 copias por célula. Este resultado está en clara oposición al límite de detección previamente registrado de ~1.800 transcripciones de ARN en citometría de flujo (Yu et ál. (1991) "Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry" *Nucleic Acids Res.* 20(1):83-8), lo que sugiere que los ensayos FC-QMAGEX pueden detectar una cantidad mucho más grande de genes funcionalmente pertinentes en la célula. En FC-QMAGEX, las células SKBR3, que contienen una amplificación del gen Her-2, demostraron un nivel aproximadamente 10 veces

mayor de expresión de Her-2 que las células HeLa, lo que concuerda con la observación anterior cuando se examina en sustrato vítreo (Paneles A-B de la Figura 13). Cabe destacar que la línea celular SKBR3 muestra un intervalo más amplio de intensidades fluorescentes que las células HeLa. Esto se debe probablemente a distintos niveles de amplificación génica en distintas células, lo que genera diversos grados de expresión de Her-2, un fenómeno que no ocurriría en células HeLa que portan una cantidad de copias génicas normal. Estos resultados demuestran la viabilidad de la detección de ARNm basales y sobreexpresados en una población celular mixta usando FC-QMAGEX. Cabe destacar que estos experimentos indican que las CTC que sobreexpresan los marcadores de células cancerosas se pueden identificar mediante QMAGEX por separado de WBC sin enriquecimiento debido a la rápida velocidad de extracción de muestras de más de 20.000 células por segundo mediante citometría de flujo.

Detección de transcripciones de ARNm en secciones de tejido FFPE y micromatrices

La sección de tejido FFPE es un tipo de muestra ampliamente utilizado en patología. En general, se considera que es más difícil trabajar con las secciones de tejido FFPE que con las líneas celulares y células sanguíneas debido a problemas adicionales, como el acceso a la diana, estabilidad del ARN y autofluorescencia. Sin embargo, las técnicas que se describen en la presente permiten la detección conveniente de ácidos nucleicos en secciones de tejido FFPE. Los siguientes experimentos ilustran el potencial y la capacidad de QMAGEX de realizar detección in situ de transcripciones de ARN en este tipo particular de muestra. La Figura 22 ilustra la detección de varias dianas en la sección de tejido FFPE de cáncer de mama. Los Paneles A y B de la Figura 22 ilustran la detección de genes con niveles elevados de expresión (>1.000 copias por célula), tales como 18S (Alexa- 488) y beta-actina (Fast Red) (Paneles A y B de la Figura 22, respectivamente). La detección de los genes de expresión de nivel medio (>100 y <1.000) tal como CK19 (Fast Red) se ilustra en el Panel C de la Figura 22. CK19 es un marcador para células epiteliales y células epiteliales cancerosas. El hecho de que ARN CK19 se detecte específicamente en células epiteliales y epiteliales cancerosas, pero no en células estromales cercanas (Panel C de la Figura 22), y el hecho de que la referencia del ensayo sea muy baja en sección de tejido FFPE (Panel D de la Figura 22), indica que el ensayo FFPE-MAGEX es muy específico y también es aplicable a detección de ARN de copias muy bajas. Las técnicas son similares a las descritas para la detección de ARN in situ en líneas celulares, si bien las secciones de tejido FFPE también se someten en primer lugar a desparafinización, desreticulación y reducción de autofluorescencia usando técnicas estándar.

Un experimento adicional que muestra que las técnicas descritas en la presente permiten la detección de ARN de copias bajas en secciones de tejido FFPE se ilustra en la Figura 23, que ilustra la detección de ARNm Her-2 en muestras de FFPE de cáncer de mama. Secciones FFPE de tejido de cáncer de mama se etiquetaron usando un ensayo MAGEX con un conjunto de sondas para el marcador de Her-2 (Paneles A-C de la Figura 23) o sin sonda diana (Paneles D-F de la Figura 23). La columna izquierda (Paneles A y D) muestra la tinción con hematoxilina de Gill de los núcleos celulares en las secciones de tejido. La columna del medio (Paneles B y E) muestra la sección de tejido teñida con un ensayo MAGEX usando la sonda Her-2 (Panel B) o sin sonda diana (Panel E) junto con el sustrato Fast Red. La columna derecha muestra las imágenes fusionadas para Her-2/hematoxilina de Gill (Panel C) y sin sonda diana/hematoxilina de Gill (Panel F). Her-2 de bajas copias se visualiza fácilmente y se cuantifica opcionalmente en las muestras FFPE.

La Figura 24 ilustra la detección de ARNm en muestras de FFPE de micromatriz de tejido (TMA, por sus siglas en inglés) de cáncer de mama. La micromatriz de tejido FFPE de tejidos de cáncer de mama se etiquetaron con un ensayo MAGEX con Ck19 (Figura 24 columna izquierda, Paneles A, D y G), Her-2 (columna derecha, Paneles C, F e I) o sin sonda diana (columna del medio, Paneles B, E y H). La fila superior (Paneles A-C) muestra la tinción de hematoxilina de Gill de los núcleos celulares en las secciones de tejido. La fila del medio (Paneles D-F) muestra las secciones de tejido etiquetadas con el ensayo MAGEX con una sonda Ck19 (Panel D), sonda Her-2 (Panel F) o sin sonda diana (Panel E) junto con Fast Red como sustrato. La fila inferior muestra imágenes fusionadas para Ck19/hematoxilina de Gill (Panel G), Her-2/hematoxilina de Gill (Panel I) y sin diana sonda/hematoxilina de Gill (Panel H).

Identificación de CTC en pacientes con cáncer de mama

Como se indicó, un ejemplo de aplicación de técnicas que se describe en la presente es la identificación de CTC. La Figura 25 ilustra la identificación de CTC en muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama.

Las células nucleadas se purificaron en primer lugar a partir de muestras de sangre de pacientes. Luego, las células se fijaron en portaobjetos de vidrio y se usó un ensayo MAGEX con Ck19 como el marcador para identificar las células cancerosas. Los Paneles A-D de la Figura 25 muestran el etiquetado de Ck19 con MAGEX de las células cancerosas en muestras de células sanguíneas de cuatro pacientes.

Ejemplo de panel marcador

Como se indicó anteriormente, es posible emplear diversos marcadores para identificar los diversos tipos celulares, que incluyen, por ejemplo, CTC. Simplemente como un ejemplo, es posible emplear un panel de marcadores que incluye las transcripciones de ARNm CK19, MamA (mamaglobina A), CD45, y/o Her-2, por ejemplo, en un ensayo

QMAGEX 4-plex que identifica y caracteriza células SKBR3 añadidas a la sangre o CTC en pacientes con cáncer de mama metastásico. CK19 ha demostrado ser un marcador genérico muy expresado para células tumorales de origen epitelial. Hemos demostrado su sensibilidad y especificidad para distinguir células cancerosas de glóbulos blancos. MamA es otro marcador establecido para distinguir las células de cáncer de mama de las células sanguíneas (analizado por Lacroix (2006) "Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells" *Endocr Relat Cancer*. 13(4): 1033- 67). Este marcador es particularmente útil para eliminar los posibles falsos positivos para CK19 de células epiteliales cutáneas que se introducen mediante aspiración de sangre con aguja. CD45 se puede usar como marcador negativo para células cancerosas dado que es un marcador conocido para células sanguíneas y hemos determinado que no tiene expresión en células cancerosas. En la presente se usa Her-2 para demostrar la capacidad de QMAGEX de proporcionar información funcional sobre las CTC. Diversos estudios han demostrado que la amplificación del gen Her-2 puede detectarse en CTC no solamente en pacientes cuyo tumor primario sea HER2+, sino también en algunos pacientes cuyo tumor primario sea HER2- (por ejemplo, Hayes et ál. (2002) "Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer" *Int J Oncol*. 21(5): 1111-7, Meng et ál. (2004) "HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses" *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101 (25):9393-9398, y Wulfing et ál. (2006) "HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients" *Clin Cancer Res*. 12(6): 1715-20). Cabe destacar que los pacientes con cáncer de mama cuyo tumor primario es HER2- pero CTC HER2+ puede responder al tratamiento con herceptin, lo que sugiere que determinar el estado de HER2 en CTC podría ser una manera eficaz de guiar la terapia dirigida (Meng et ál. (2004) supra). En la reunión de ASCO de 2007, hubo una serie de estudios que demostraron que algunos pacientes con tumor primario de estado HER2- también se pueden beneficiar del tratamiento con herceptin (por ejemplo, Paik et ál. (2007) "Benefit from adjuvant trastuzumab may not be confined to patients with IHC 3+ and/or FISH-positive tumors: central testing results from NSABP B-31" Program and abstracts of the 43rd American Society of Clinical Oncology Annual Meeting; junio 1-5, 2007; Chicago, Illinois. Abstract 511). Por lo tanto, sería valioso investigar si el estado de HER2 en CTC puede ser útil como marcador sustituto para la selección de la terapia dirigida. Creemos que ARNm Her-2 es posiblemente un marcador más preciso que la amplificación del gen ADN HER2 dado que está relacionado de manera más directa con su expresión de proteínas. En resumen, se usan tres de los cuatro marcadores de ARN (CK19, MamA y CD45) para detectar y distinguir las células de cáncer de mama en sangre mediante «condicionamiento booleano» (uso de más de un marcador independiente para aumentar la especificidad de detección y disminuir los falsos positivos, como se describió anteriormente) y se usa un marcador (Her-2) para proporcionar información funcional acerca de las CTC. También se pueden emplear marcadores de ARN adicionales para la detección de células de cáncer de mama en sangre (por ejemplo, ver análisis de Lacroix (2006) supra).

La Figura 28 muestra los datos de validación experimental de nueve marcadores de ARN (CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Muc1 y EGFR) seleccionados para identificar CTC de tipo epitelial. La Figura 29 muestra los datos de validación experimental de tres marcadores de ARN (Twist, N-Cadherina y Fibronectina) seleccionados para identificar las CTC EMT. La Figura 30 muestra las señales comparativas de células tumorales añadidas usando grupos marcadores CK19, pan-CK y pan-CTC.

Materiales y métodos

Cultivo celular e inducción de PMA

Todas las líneas celulares se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA) y se cultivaron en el medio adecuado. Las células se cultivaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con una dilución 1:10 de solución de poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, Inc.; St. Louis, MO) usando las condiciones proporcionadas por la ATCC. Para los experimentos de inducción de PMA; se cultivaron células HeLa hasta 60 %-70 % de confluencia (18-20 h a 37 °C) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10 % de suero seguido de DMEM sin suero durante 18 h. Luego, las células se trataron con 10 ng/ ml de PMA (CalBiochem, San Diego) en DMEM sin suero y se recogieron en varios momentos para el análisis.

Fijación y almacenamiento celular

Las células cultivadas en cubreobjetos se fijaron con 4 % de formaldehído en PBS (amortiguador de fosfato 0.01 M, pH7.5) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células fijadas se lavaron en PBS, se deshidrataron a través de una serie de etanol graduado (50 %, 70 % y 100 %) a temperatura ambiente y se almacenaron en 100 % de etanol a -20 °C. Para la tinción in situ en suspensión, las células se tripsinizaron y recogieron mediante centrifugación a 290 g durante 10 min a temperatura ambiente. Los sedimentos se volvieron a suspender en 1XPBS y se centrifugaron a 290 g durante 10 min a temperatura ambiente. Las células en suspensión se volvieron a suspender en 4 % de formaldehído en 1X PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se recogieron mediante centrifugación y se deshidrataron de la misma manera que para las células cultivadas en cubreobjetos.

Sondas de oligonucleótidos y sistema de amplificación de señales

Las sondas diana se diseñaron usando el software Probe Design modificado (ProbeDesigner™ de Panomics, Inc.; ver, también, Bushnell et ál. (1999) "ProbeDesigner: for the design of probe sets for branched DNA (bDNA) signal

amplification assays Bioinformatics 15:348-55). Se usaron 13 pares de oligonucleótidos de ADN que contienen la secuencia complementaria a una región única de ARNr 18S para etiquetar ARNr 18S. Se usaron 52 pares de oligonucleótidos de ADN complementarios a una región en ERBB2(Her-2) en la detección de ARNm Her-2. Se usaron 23 pares de oligonucleótidos de ADN complementarios a una región de interleucina-6 (IL-6) en la detección de ARNm IL- 6. Se usaron 20 pares de oligonucleótidos de ADN complementarios a una región única de interleucina-8 (IL-8) en la detección de ARNm IL-8. Sistema de amplificación de señales que incluye preAMP y AMP y moléculas fluorescentes o sondas de etiqueta conjugadas con fosfatasa alcalina (AP).

Hibridación de ARN in situ en células cultivadas en cubreobjetos

Las células fijadas se volvieron a hidratar mediante una serie de etanol graduado (100 %, 70 % y 50 %) y se lavaron 3 veces en PBS. Para acceder al ARN nuclear, las células se lavaron en 1XPBS con 0,1 % de Tween 20 durante 3 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron en 2,5-5 µg/ml de proteinasa K en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS durante 10 min en total. Después del tratamiento con proteinasa K, las células se incubaron con 1 pmol de sondas diana en amortiguador diana con 6X SSC, 25 % de formamida, 0,2 % de Brij-35, 0,2 % de caseína y 0,25 % de reactivo de bloqueo (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) a 40 °C en una cámara humidificadora durante 3 horas. Para la detección de ARNr 18S, es suficiente 0,2 pmol de sonda diana y 1,5 h de tiempo de incubación a 45 °C en una cámara humidificadora. Las células se lavaron a temperatura ambiente con 2X SSC, 0,2X SSC y 0,1 X SSC con 0,0025 % de detergente Brij-35 durante 2 min cada uno. Luego, las células se incubaron con 100 fmol de preAMP en amortiguador de hibridación B (15 % de formamida, 5X SSC, 0,3 % de SDS, 10 % de sulfato de dextrano, 1 mM de ZnCl₂, 10 mM de MgCl₂, 0,025 % de reactivo de bloqueo (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 0,1 mg/ml de ADN cs desnaturalizado y 50 µg/ml de ARNt de levadura) en una cámara humidificadora a 40 °C durante 25 min. Los cubreobjetos se lavaron en 0,1X SSC con 1 mM de EDTA 2 veces durante 2 min y 5 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con 100 fmol de AMP en amortiguador de hibridación B en una cámara humidificadora a 40°C durante 15 min. Los cubreobjetos se lavaron en 0,1X SSC con 1 mM de EDTA 2 veces durante 2 min y 5 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con 100 fmol de sonda de etiqueta conjugada con AMP o 5 pmol de sonda de etiqueta conjugada con moléculas fluorescentes en amortiguador de hibridación C (5X SSC, 0,3 % de SDS, 10 % de sulfato de dextrano, 1 mM de ZnCl₂, 10 mM de MgCl₂, 0,025 % de reactivo de bloqueo, 0,1 mg/ml de ADN cs desnaturalizado y 50 µg/ml de ARNt de levadura) en una cámara humidificadora a 40 °C durante 15 min. Los cubreobjetos se lavaron en 0,1X SSC con 1 mM de EDTA 2 veces durante 2 min y 5 min a temperatura ambiente. Si se usó la sonda de etiqueta conjugada con AP, las células se incubaron en Tris-HCl, pH8 con 0,1 % de Brij-35, 1 mM de ZnCl₂ y 10 mM de MgCl₂ durante 5 min seguido de exposición de las células a sustrato Fast Red (Dako, Carpinteria, CA) durante 10 min a temperatura ambiente. Para usar el sistema 16X AMP, se usaron preAMP, AMP y sondas de etiqueta a concentraciones de 1 pmol, 1 pmol y 5 pmol. Se montaron cubreobjetos sobre portaobjetos usando Vectashield con DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) o medio Prolong Gold anti-Fade Mounting (Invitrogen, Carlsbad,CA).

Hibridación de ARN in situ en células en suspensión

Las células fijadas se recogieron mediante centrifugación a 290 g durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se volvieron a hidratar a través de una serie de etanol (100 %, 70 % y 50 %) y se lavaron con 100 µl 1XPBS con 2 % de BSA 2 veces. Las células se volvieron a suspender y se incubaron en 100 µl de 1XPBS con 0,25-0,5 µg de proteinasa K durante 8 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después de 8 min de incubación con solución de proteinasa K, se agregaron 25 µl de BSA al 10 % y las células se centrifugaron a 290 g durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y las células se volvieron a suspender en 100 µl 1XPBS con 2 % de BSA. Las células se centrifugaron a 290 g durante 5 min y se volvieron a suspender en 100 µl de 1XPBS con 2 % de BSA. Después de la centrifugación a 290 g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y las células volvieron a suspenderse en 100 µl de amortiguador diana con 1 pmol de sondas diana para incubar en un baño de agua a 40 °C durante 3 h. Después de la hibridación, se agregaron 25 µl de 10 % de BSA a cada muestra y se centrifugaron a 290 g durante 5 min. Las células se lavaron a temperatura ambiente con 2X SSC, 0,2X SSC y 0,1 X SSC con 0,0025 % de Brij-35 y 2 % de BSA durante 2 min cada uno. Luego, las células se incubaron con 300 fmol de preAMP en amortiguador de hibridación B' B (15 % de formamida, 5X SSC, 0,3 % de SDS, 5 % de sulfato de dextrano, 1 mM de ZnCl₂, 10 mM de MgCl₂, 0,025 % de reactivo de bloqueo (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 0,1 mg/ml de ADN cs desnaturalizado y 50 µg/ml de ARNt de levadura) en un baño de agua a 40 °C durante 25 min. Después de la hibridación, se agregaron 25 µl de BSA al 10 % a cada muestra y se centrifugaron a 290 g durante 5 min para recoger los sedimentos celulares. Los sedimentos volvieron a suspenderse y lavarse en 0,1X SSC con 1 mM de EDTA y 2 % de BSA 2 veces durante 2 min y 5 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con 300 fmol de AMP en amortiguador de hibridación B' en un baño de agua a 40 °C durante 15 min. Después de la hibridación, se agregaron 25 µl de BSA al 10 % a cada muestra y se centrifugaron a 290 g durante 5 min para recoger los sedimentos celulares. Las células se lavaron en 0,1X SSC con 1 mM de EDTA y 2 % de BSA 2 veces durante 2 min y 5 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con 300 fmol de sonda de etiqueta conjugada con AP o 15 pmol de sonda de etiqueta conjugada con moléculas fluorescentes en amortiguador de hibridación C' (5X SSC, 0,3 % de SDS, 5 % de sulfato de dextrano, 1 mM de ZnCl₂, 10 mM de MgCl₂, 0,025 % de reactivo de bloqueo (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 0,1 mg/ml de ADN cs desnaturalizado y 50 µg/ml de ARNt de levadura) en un baño de agua a 40 °C durante 15 min. Después de la hibridación, se agregaron 25 µl de BSA al 10 % a cada muestra y se centrifugaron a 290 g durante 5 min para recoger los sedimentos celulares. Las células se lavaron en 0,1X SSC con 1 mM de EDTA y 2 % de BSA 2 veces durante 2 min y 5 min a temperatura ambiente. Si se usó la sonda de etiqueta

5 conjugada con AP, las células se incubaron en Tris-HCl, pH8 con 0,1 % de Brij-35, 1 mM de ZnCl₂ y 10 mM de MgCl₂ durante 5 min seguido de exposición de las células a sustrato Fast Red (Dako, Carpinteria, CA) durante 10 min a temperatura ambiente. Para usar el sistema 16X preAMP/AMP, se usaron preAMP, AMP y sondas de etiqueta a concentraciones de 3 pmol, 3 pmol y 15 pmol. La intensidad fluorescente de las células individuales se analizó usando el citómetro de flujo LSR (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Análisis mediante citometría de flujo

Se analizaron las células etiquetadas en suspensión usando un citómetro de flujo LSR (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Se analizaron los datos de citometría de flujo usando el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Microscopio e imagenología

10 Los portaobjetos se visualizaron en un microscopio fluorescente Olympus IX71 y se tomaron imágenes con el software Micro Suite B3. Se midió la intensidad de los puntos fluorescentes usando CellProfiler ([www \(punto\) cellprofiler \(punto\) org](http://www.cellprofiler.org)) y se generaron imágenes usando Adobe Photoshop.

Estimación de densidad celular y cantidad de copias de ARNm

15 Para calcular la cantidad de células en cada cubreobjetos, se transfirieron 4 cubreobjetos a una placa de 24 pocillos limpia, se lavaron con PBS y se trataron con tripsina (Gibco) durante 5-10 min a temperatura ambiente hasta que las células se separaron. Se inactivó la tripsina mediante la adición de 2 volúmenes de medio con 10 % de suero y las células se centrifugaron a 200 g a temperatura ambiente durante 5 min. Las células volvieron a suspenderse en medio 100 µl y se calculó la cantidad de células usando un hemocitómetro o contador de partículas Z2 Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Para calcular la cantidad promedio de transcripciones de ARNm dentro de cada
20 célula, se transfirieron 4 cubreobjetos a una placa de 24 pocillos limpia y se lavaron con PBS. Se prepararon los lisados celulares, se almacenaron y se analizó la cantidad de copias de ARNm por célula de acuerdo con el kit de protocolo QuantiGene 2.0 (Panomics, Fremont, CA). Se calculó la cantidad de copias de ARN al comparar las señales de los ARN transcritos in vitro.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de una célula individual de un tipo determinado en una muestra que comprende una mezcla de tipos celulares, que comprende al menos una célula del tipo determinado, en donde la célula comprende una primera diana de ácido nucleico y una segunda diana de ácido nucleico, en donde las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos siempre coexisten en la célula, en donde el método comprende:
- 5 (a) proporcionar una primera sonda de etiqueta que comprende una primera etiqueta, y proporcionar una segunda sonda de etiqueta que comprende una segunda etiqueta, en donde una primera señal de la primera etiqueta no se puede distinguir de una segunda señal de la segunda etiqueta;
- (b) captar, en la célula, la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, y la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico, cuando está presente en la célula, en donde las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos son moléculas individuales, en donde captar comprende:
- 10 proporcionarle a la primera diana de ácido nucleico al menos una primera sonda de captura y proporcionarle a la segunda diana de ácido nucleico al menos una segunda sonda de captura;
- 15 captar la primera sonda de captura de la primera diana de ácido nucleico, que comprende hibridar en la célula la primera sonda de captura con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con la primera sonda de captura, captando así la primera sonda de etiqueta con la primera diana de ácido nucleico; y
- captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico, que comprende hibridar en la célula la segunda sonda de captura con el segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con la segunda sonda de captura, captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico;
- 20 (c) detectar la señal de las etiquetas;
- (d) establecer una correlación entre la señal detectada a partir de la célula y la presencia o cantidad de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos en la célula; y
- (e) identificar la célula como del tipo determinado en función de la detección de la presencia o cantidad de las primeras y segundas dianas de ácidos nucleicos dentro de la célula, en donde el tipo determinado de célula puede distinguirse de los otros tipos celulares en la mezcla según la presencia o cantidad de la primera diana de ácido nucleico y la presencia o cantidad de la segunda diana de ácido nucleico en la célula.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula dos o más primeras sondas de captura distintas con el primer ácido nucleico diana, e hibridar la primera sonda de etiqueta con dos o más primeras sondas de captura distintas, captando así la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula dos o más segundas sondas de captura distintas del segundo ácido nucleico diana, e hibridar la segunda sonda de etiqueta con dos o más segundas sondas de captura distintas, captando así la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en donde proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador, en donde el amplificador es una molécula capaz de hibridarse con múltiples sondas de etiqueta; en donde captar la primera sonda de etiqueta de la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana de dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas de captura distintas con el amplificador, e hibridar el amplificador con la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta de la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico.
- 40 45 4. El método de la reivindicación 1, en donde proporcionar al menos una primera sonda de captura comprende proporcionar dos o más primeras sondas de captura distintas como un conjunto, en donde proporcionar al menos una segunda sonda de captura comprende proporcionar dos o más segundas sondas de captura distintas como un conjunto; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador y un preamplificador; en donde captar la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el primer ácido nucleico diana con dos o más primeras sondas de captura distintas, hibridar dos o más primeras sondas de captura distintas con el preamplificador, hibridar el preamplificador con el amplificador, e hibridar el amplificador con
- 50 55

- la primera sonda de etiqueta, captando así la primera sonda de etiqueta en la primera diana de ácido nucleico; en donde captar la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico comprende hibridar en la célula el segundo ácido nucleico diana con dos o más segundas sondas de captura distintas, hibridar dos o más segundas sondas de captura distintas con el preamplificador, hibridar el preamplificador con el amplificador, e hibridar el amplificador con la segunda sonda de etiqueta, captando así la segunda sonda de etiqueta en la segunda diana de ácido nucleico.
- 5 El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador se realiza a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la sonda de etiqueta, el amplificador o el preamplificador.
- 10 El método de la reivindicación 5, en donde dos o más sondas de captura distintas se hibridan con secciones únicas y adyacentes en la diana de ácido nucleico.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con su diana de ácido nucleico correspondiente se realiza a una temperatura de hibridación inferior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico, o
- 15 donde la hibridación de dos o más sondas de captura distintas con su diana de ácido nucleico correspondiente se realiza a una temperatura de hibridación superior a una temperatura de fusión T_m de un complejo entre cada sonda de captura individual y la diana de ácido nucleico.
8. El método de la reivindicación 1, que además comprende proporcionar múltiples dianas de ácidos nucleicos adicionales; en donde el método comprende además: proporcionar múltiples sondas de etiqueta, cada una de las cuales comprende una etiqueta, en donde la señal de cada etiqueta no se puede distinguir de las primeras y segundas señales o entre sí; proporcionar al menos una sonda de captura para cada una de las dianas de ácidos nucleicos adicionales, hibridar en la célula cada sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula, e hibridar cada sonda de etiqueta con su sonda de captura correspondiente, y detectar la señal a partir de las etiquetas.
- 20 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la primera diana de ácido nucleico y la segunda diana de ácido nucleico se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un ADN, un ARN, un ADN cromosómico, un ARNm, un ácido nucleico endógeno de la célula, un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno y un ARN citoplásmico.
- 30 10. El método de la reivindicación 9, en donde:
- (i) la primera diana de ácido nucleico es un primer ARNm y donde la segunda diana de ácido nucleico es un segundo ARNm; o
- (ii) la primera diana de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico y donde la segunda diana de ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos de ADN cromosómico; o
- 35 (iii) la primera diana de ácido nucleico y/o la segunda diana de ácido nucleico comprende una molécula de ADN de cadena doble, el método comprende desnaturalizar el ADN de cadena doble antes de la hibridación de las primeras y segundas sondas de captura con las primeras y segundas dianas de ácido nucleico.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde:
- 40 (i) aproximadamente 1000 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 1000 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o
- (ii) aproximadamente 100 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 100 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o
- 45 (iii) aproximadamente 10 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 10 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o
- (iv) aproximadamente 5 copias o menos de la primera diana de ácido nucleico y/o aproximadamente 5 copias o menos de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula; o
- (v) una única copia de la primera diana de ácido nucleico y/o una única copia de la segunda diana de ácido nucleico están presentes en la célula.
- 50 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la primera diana de ácido nucleico, la segunda diana de ácido nucleico y/o la diana de ácido nucleico adicional se seleccionan del grupo que consiste en: CK8, CK14, CK17, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Mucl, EGFR, Twist, N-Cadherina y Fibronectina.

13. Un método para la detección de la presencia o ausencia de múltiples dianas de ácido nucleico en una célula individual en una muestra que comprende la célula, que comprende o se sospecha que comprende dichas múltiples dianas de ácido nucleico, en donde dichas dianas de ácido nucleico siempre coexisten en la célula, en donde el método comprende:

- 5 (a) proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, una sonda de etiqueta que comprende una etiqueta, en donde una señal de la etiqueta de una primera diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico no se puede distinguir de una señal de la etiqueta de una segunda diana de ácido nucleico en las múltiples dianas de ácido nucleico, en donde las primeras y segundas dianas de ácido nucleico son moléculas individuales;
- 10 (b) proporcionar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, al menos una sonda de captura;
- (c) hibridar en la célula, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de captura con su diana de ácido nucleico correspondiente, cuando está presente en la célula;
- (d) captar, para cada una de las múltiples dianas de ácido nucleico, la sonda de etiqueta de la sonda de captura, captando así la sonda de etiqueta de su diana de ácido nucleico correspondiente; y
- 15 (e) detectar la señal de la etiqueta de las sondas de etiqueta captadas de las múltiples dianas de ácido nucleico,

en donde la presencia de señal indica la presencia de un miembro de las múltiples dianas de ácido nucleico y la ausencia de señal indica la ausencia de las dianas de ácido nucleico en la célula.

14. El método de la reivindicación 13, en donde las múltiples dianas de ácido nucleico comprenden genes constitutivos de distintos tejidos en una especie particular, en donde la especie es preferiblemente un humano.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en donde:

- 25 (i) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde cada una de dos o más sondas de captura comprende una sección T que es complementaria a una región de su diana de ácido nucleico correspondiente y una sección L que es complementaria a una región de su sonda de etiqueta correspondiente; además, las secciones T de dos o más sondas de captura son complementarias a regiones no superpuestas de la diana de ácido nucleico y las secciones L de dos o más sondas de captura son complementarias a regiones no superpuestas de la sonda de etiqueta, y donde el método comprende hibridar una sonda de etiqueta con dos o más sondas de captura;
- 30 (ii) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador; y donde el método comprende hibridar una sonda de etiqueta con un amplificador e hibridar el amplificador con dichas dos o más sondas de captura; o
- 35 (iii) proporcionar al menos una sonda de captura comprende proporcionar dos o más sondas de captura; en donde el método comprende además proporcionar un amplificador y un preamplificador; y donde el método comprende hibridar el preamplificador con dos o más sondas de captura, hibridar el amplificador con el preamplificador e hibridar una sonda de etiqueta con el amplificador.

16. El método de la reivindicación 15(i), que comprende la etapa de hibridar cada conjunto de dos o más sondas de captura con el ácido nucleico diana correspondiente a una temperatura de hibridación (a) superior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto, o (b) superior a la temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto.

40 17. El método de la reivindicación 16, que comprende la etapa de hibridar cada conjunto de dos o más sondas de captura con el ácido nucleico diana correspondiente a una temperatura de hibridación (a) superior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto e inferior a la temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto, o (b) superior a la temperatura de fusión de cada sección L de dos o más sondas de captura en el conjunto e inferior a la temperatura de fusión de cada sección T de dos o más sondas de captura en el conjunto.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en donde las múltiples dianas de ácido nucleico se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un ADN, un ARN, un ADN cromosómico, un ARNm, un ácido nucleico endógeno de la célula, un ácido nucleico introducido o expresado en la célula mediante infección de la célula con un patógeno y ARN citoplásmicos.

50 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15(i), y 16-17, en donde dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 5' de las secciones L, o donde dos o más sondas de captura en cada conjunto tienen las secciones T 3' de las secciones L.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde cada etapa de hibridación o captura se logra

para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la célula es una célula tumoral en circulación.

5 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la célula se encuentra en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o donde la célula se encuentra en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la muestra que comprende la célula deriva de un fluido corporal, sangre o una sección de tejido.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde proporcionar una muestra comprende fijar y permeabilizar la célula.

10 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el método comprende lavar la célula para retirar los materiales no captados en una de las dianas de ácido nucleico.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la detección de la señal comprende realizar citometría de flujo.

15

Fig. 1

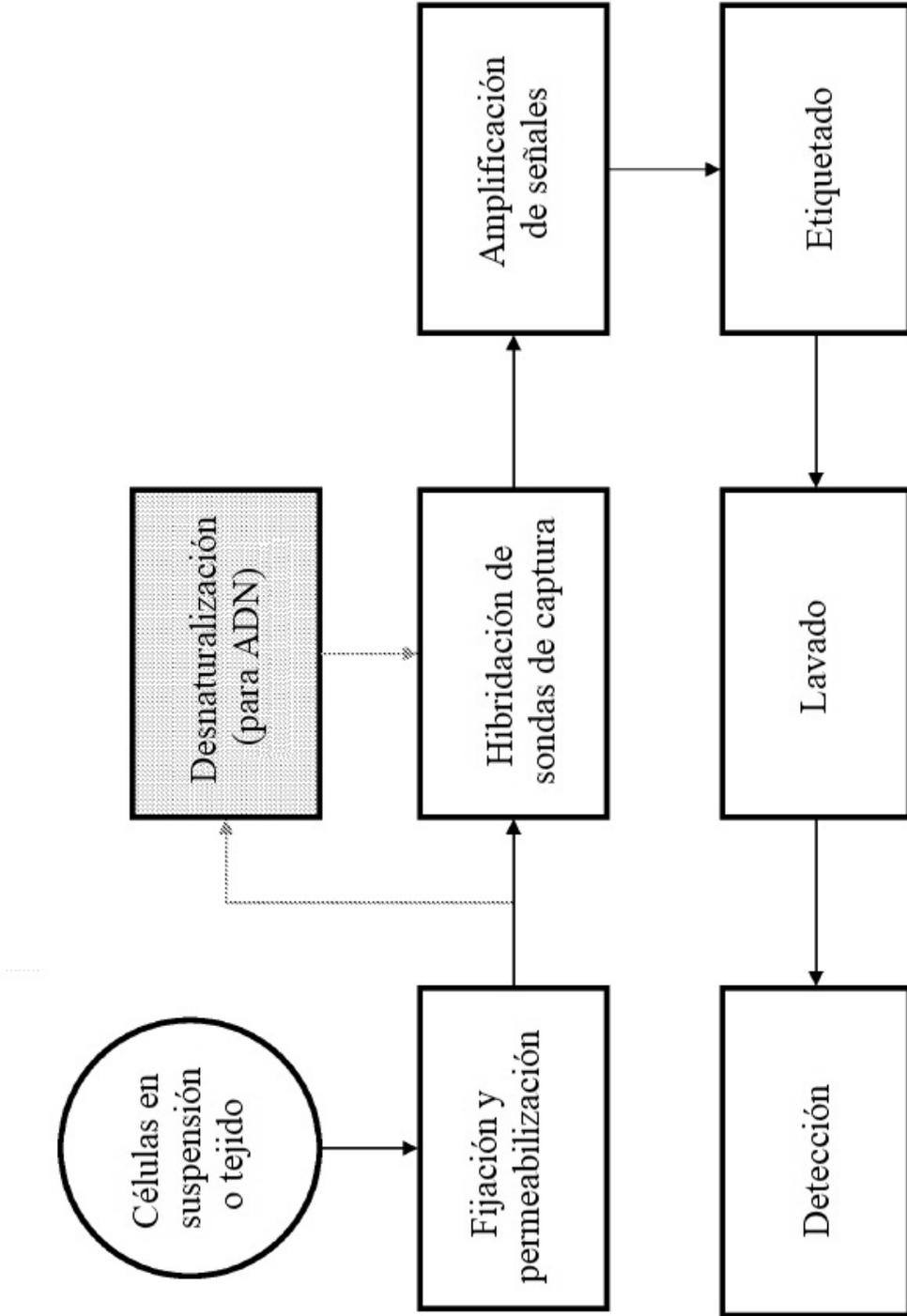


Fig. 2

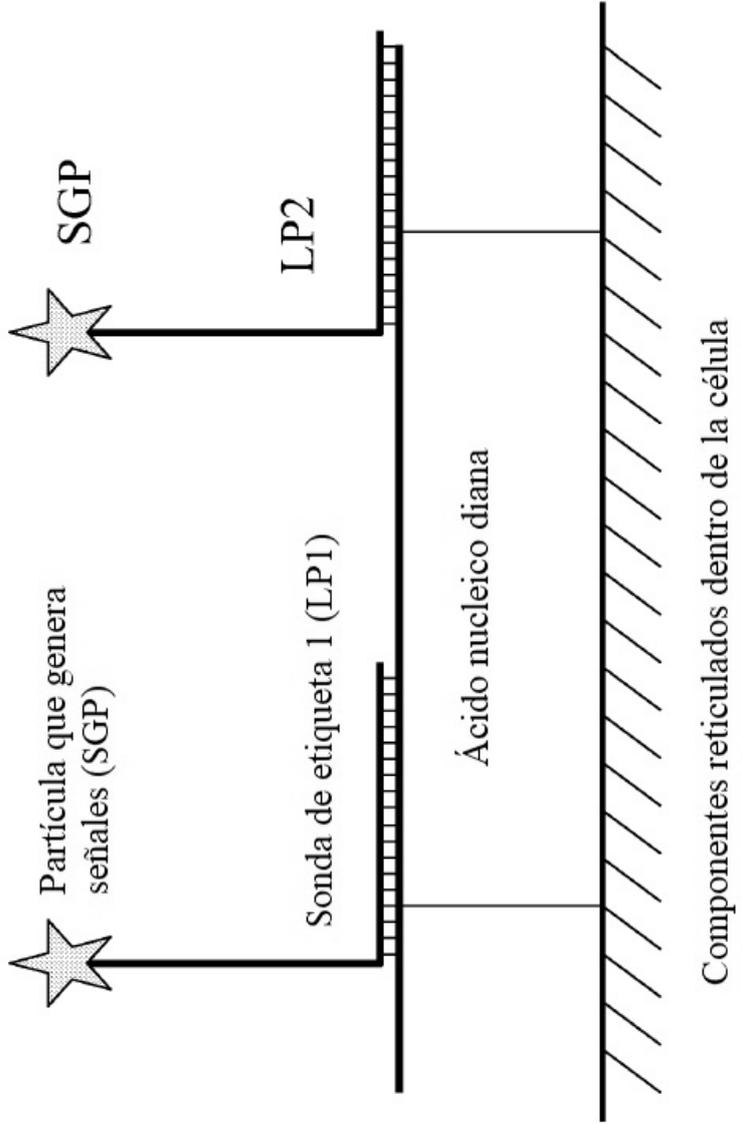


Fig. 3

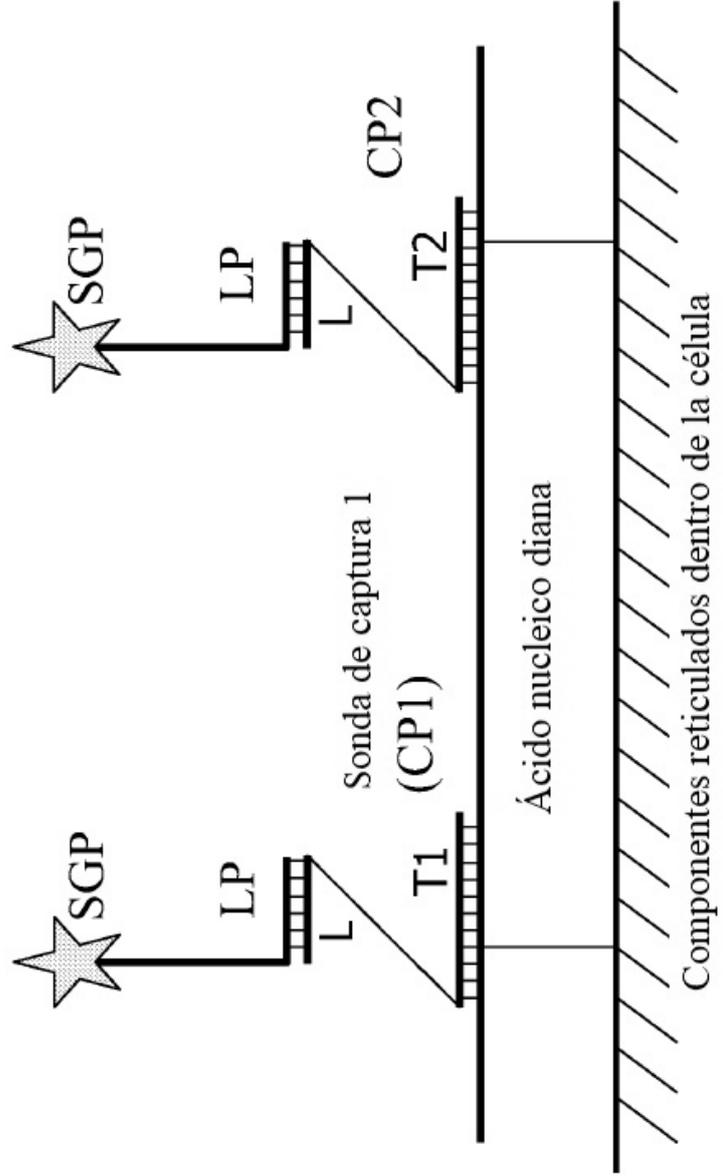


Fig. 4

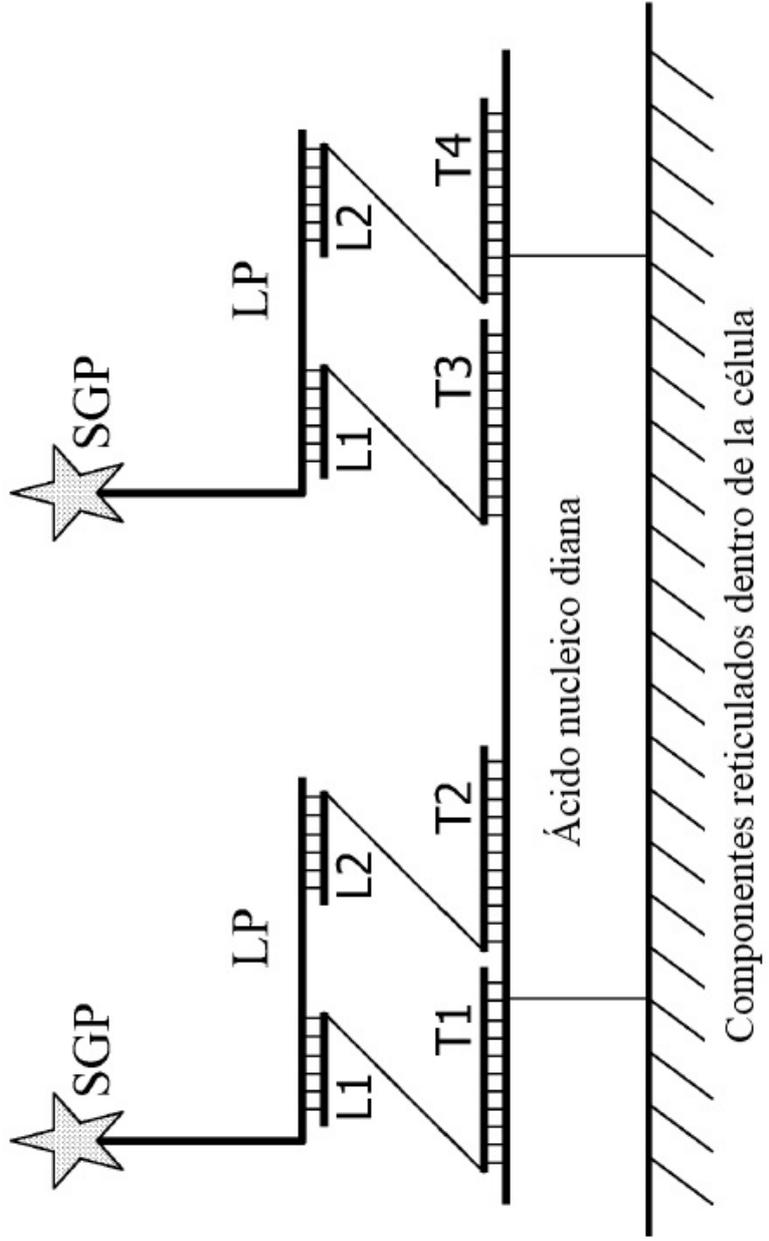


Fig. 5

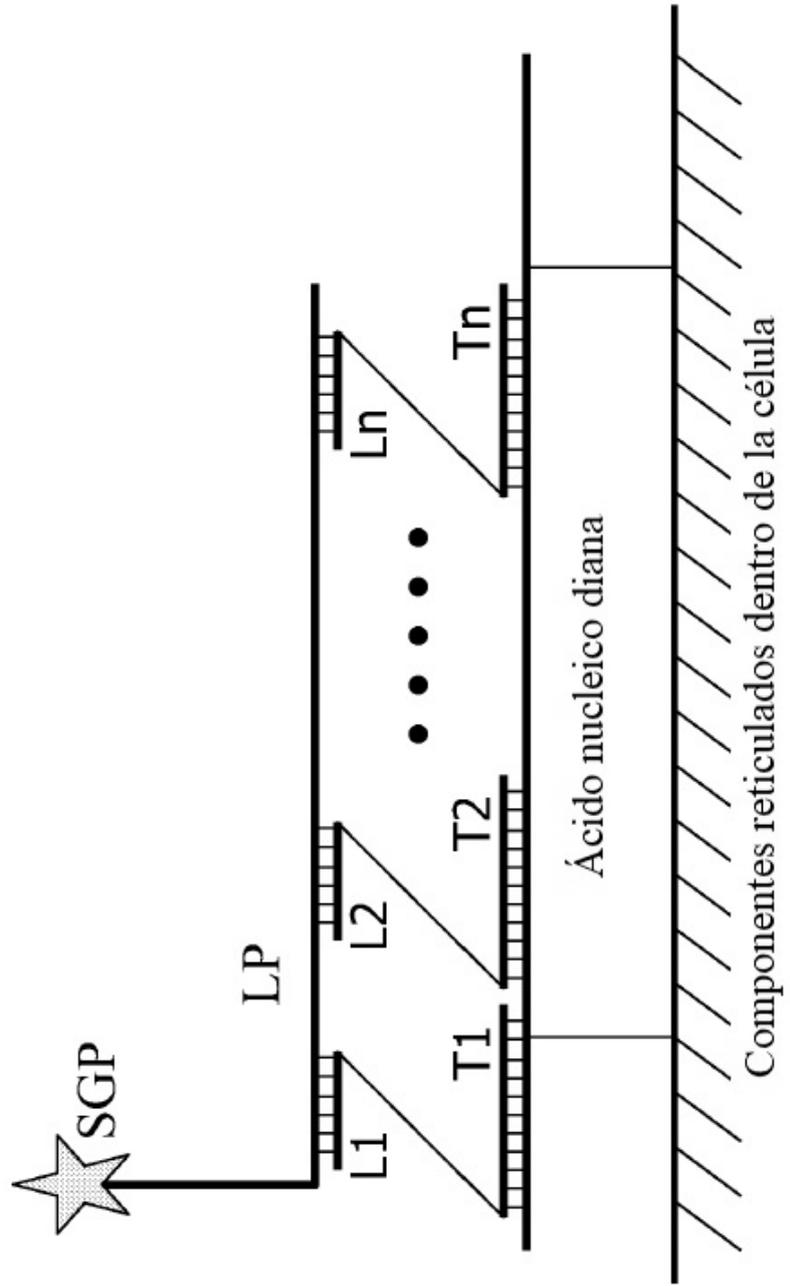


Fig. 6

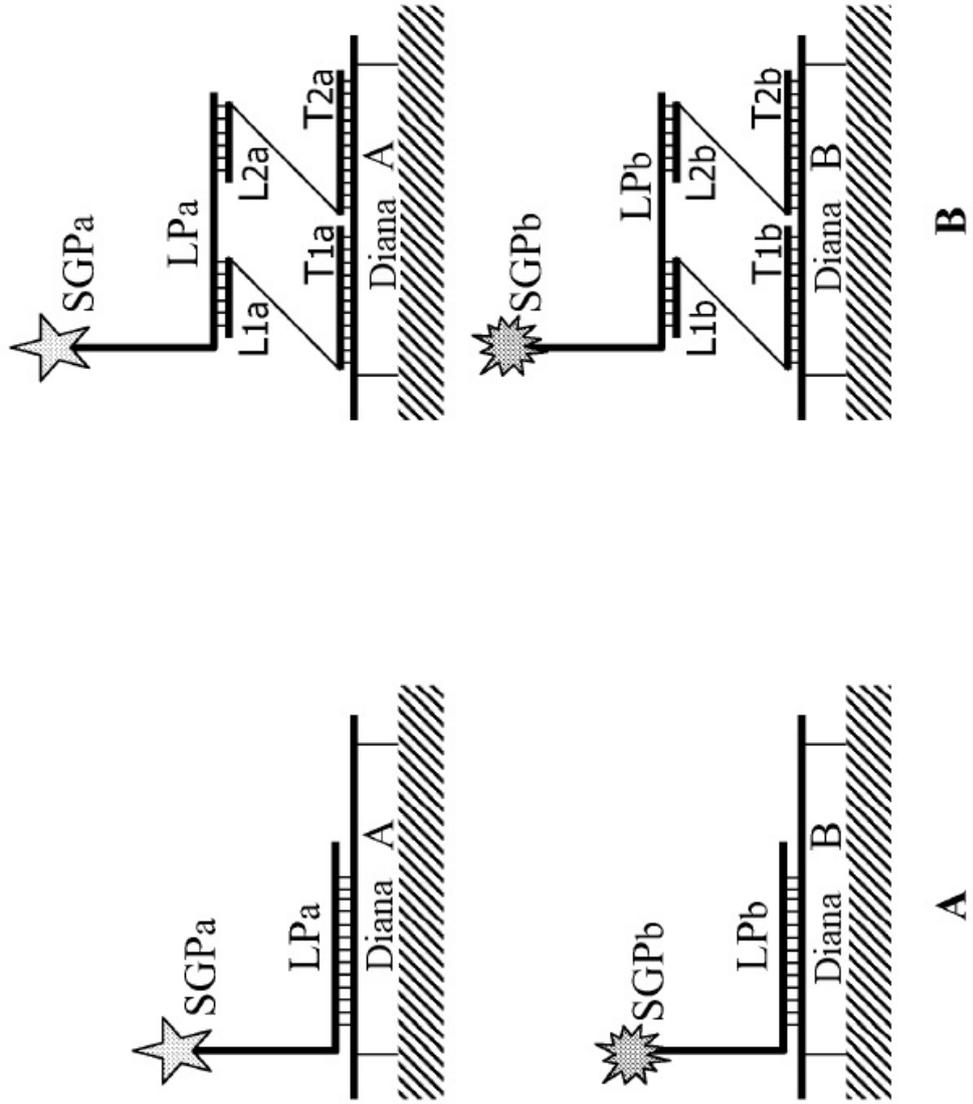


Fig. 7

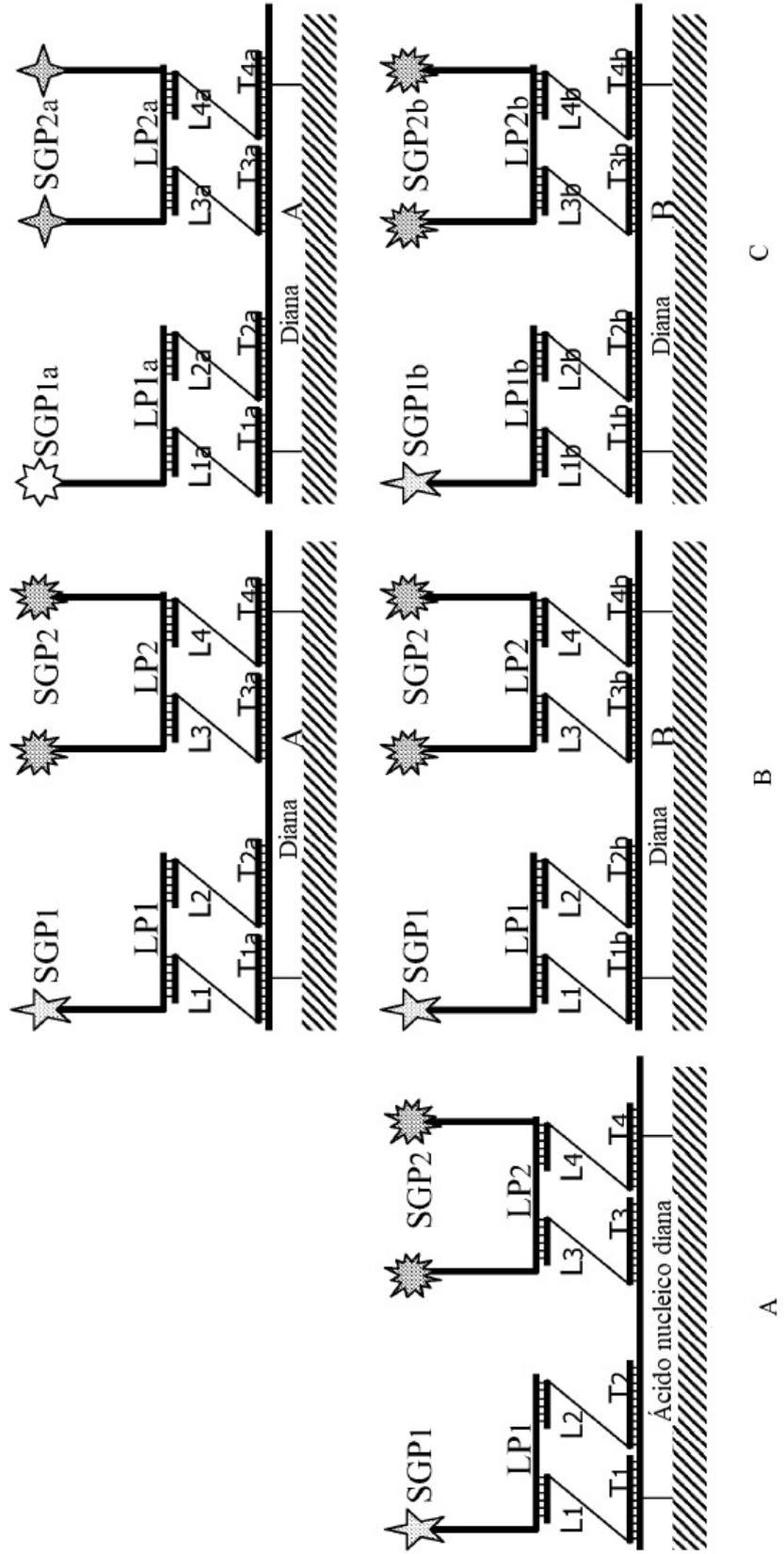


Fig. 8

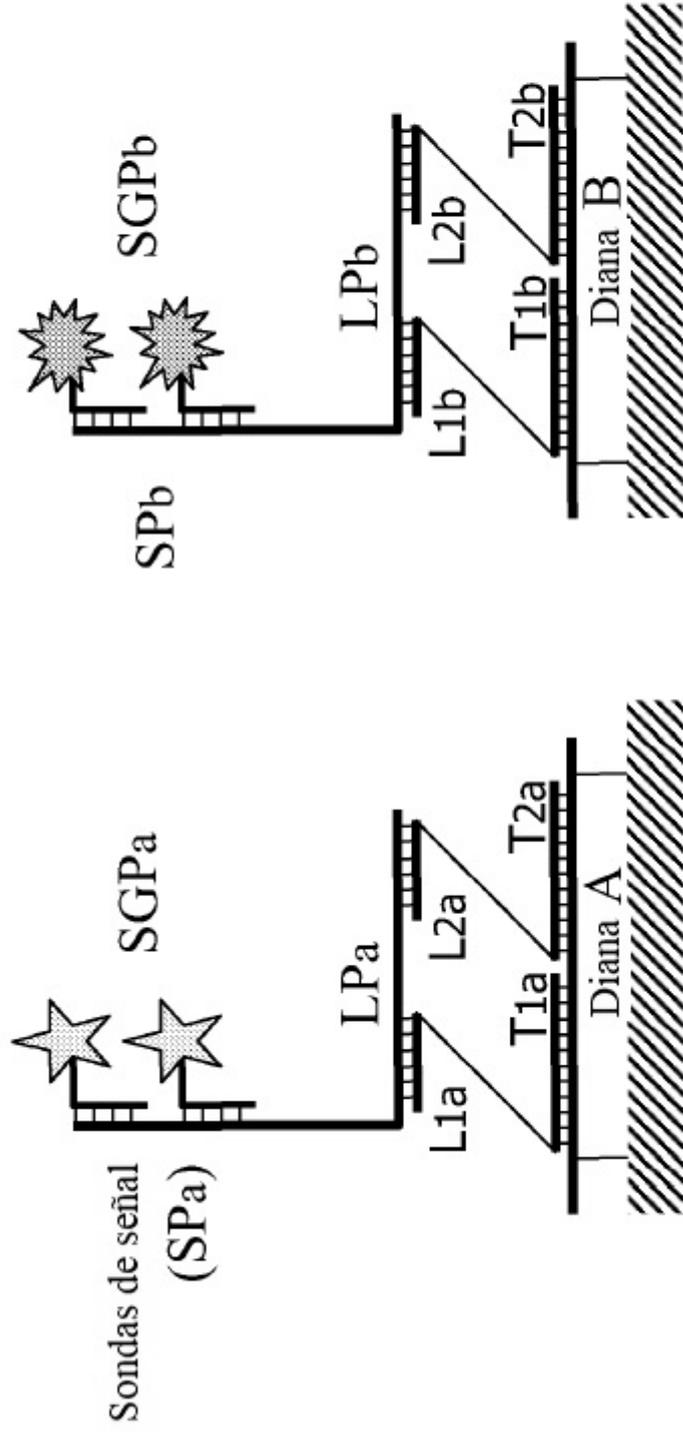


Fig.9

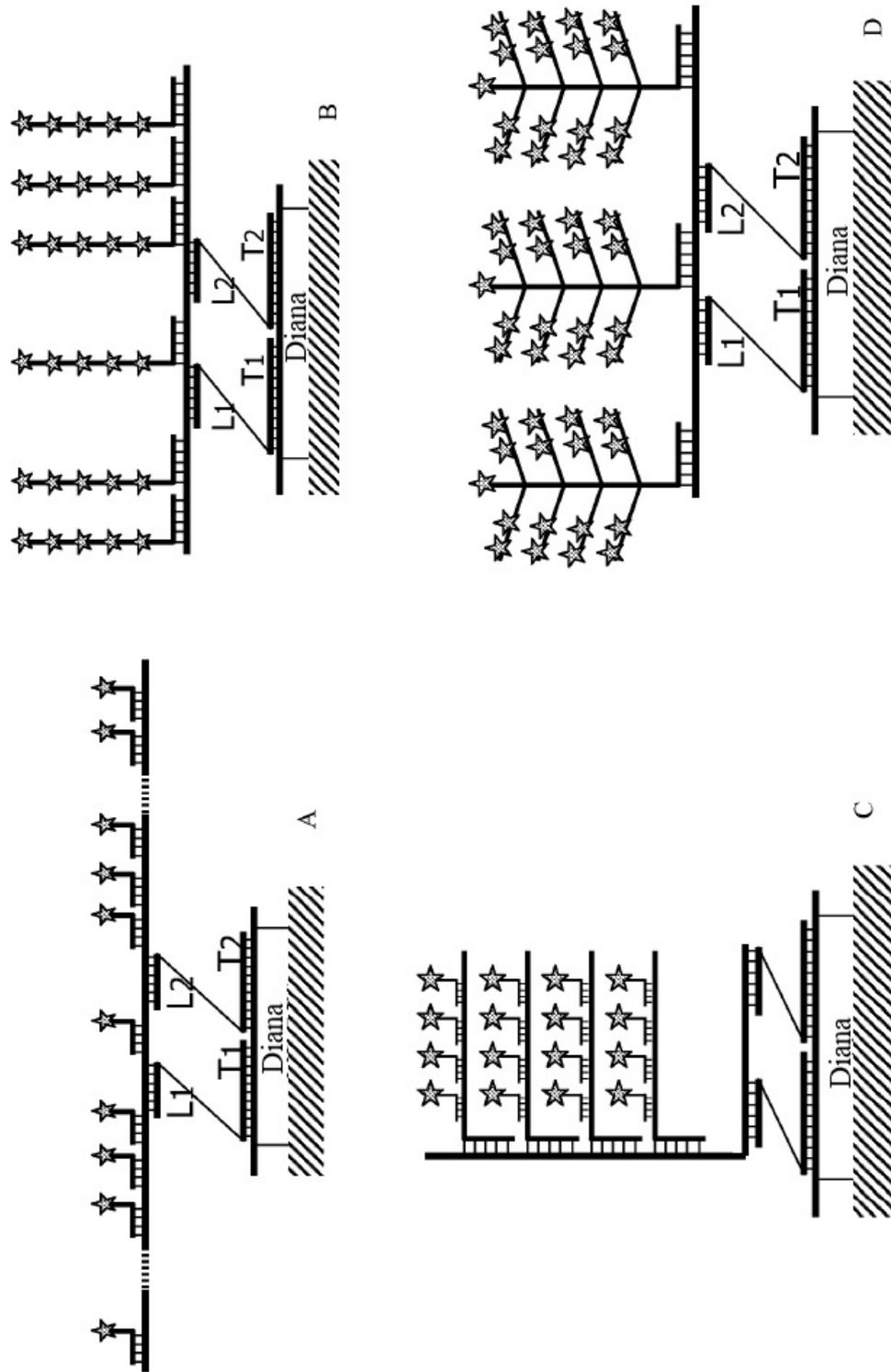


Fig.10

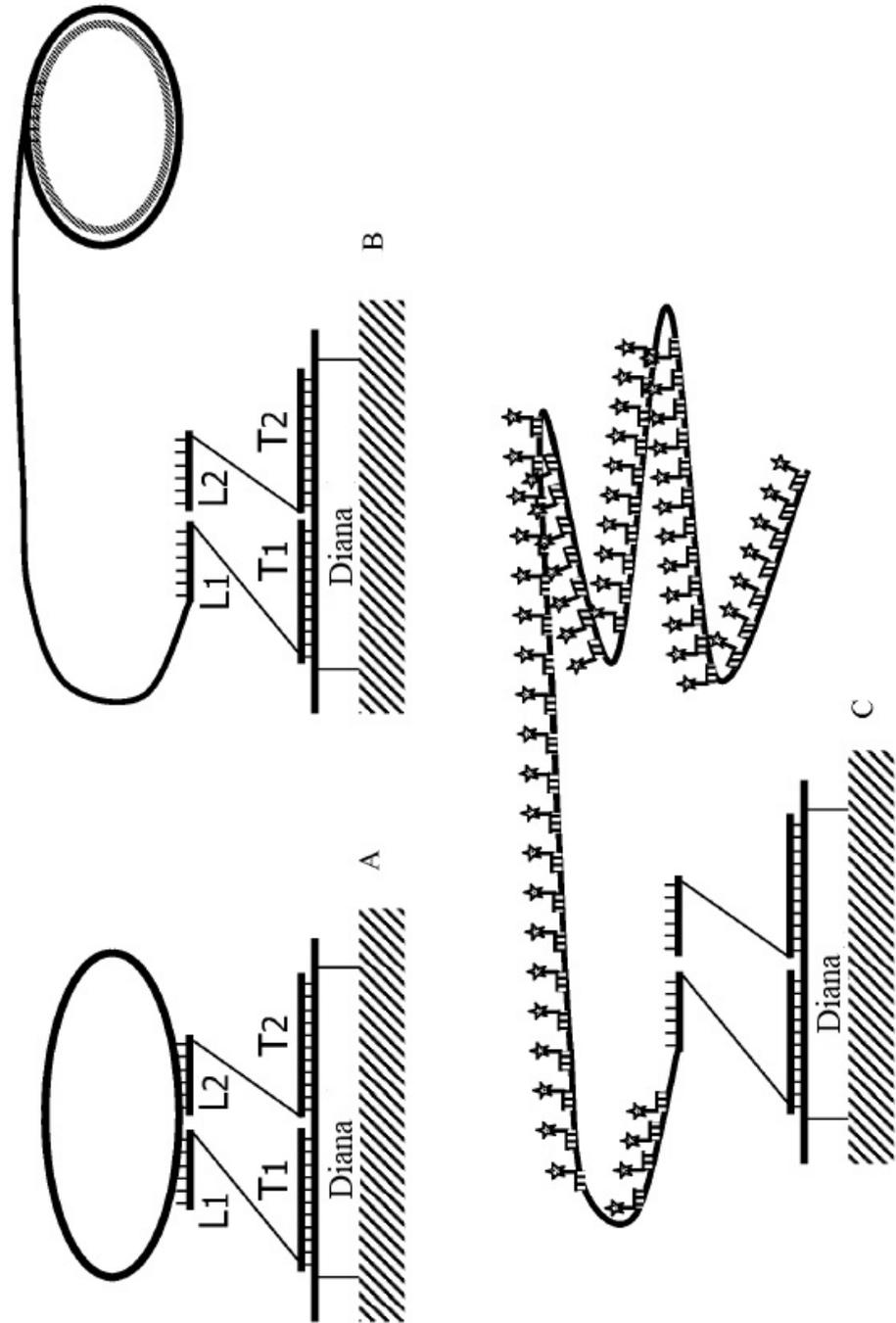


Fig. 11

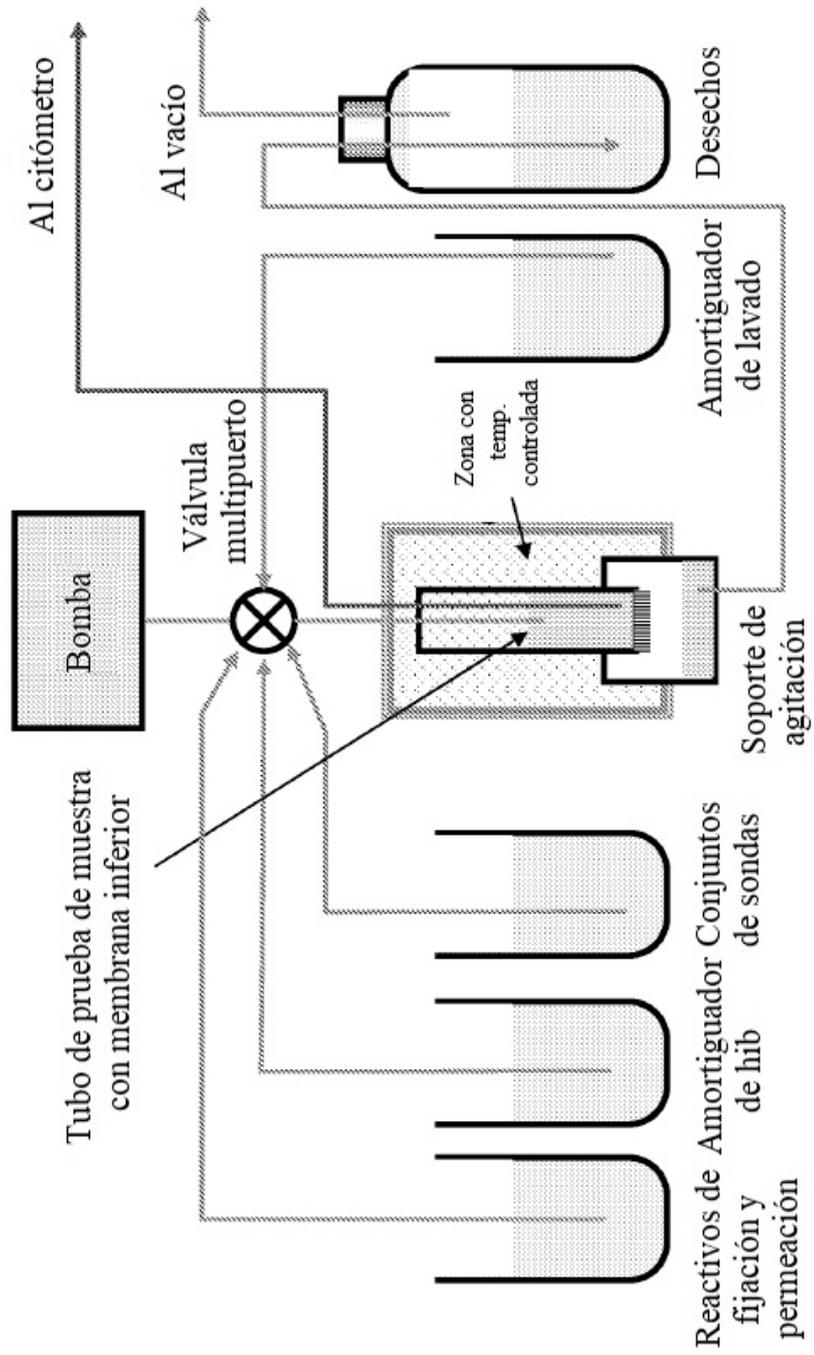


Fig. 12

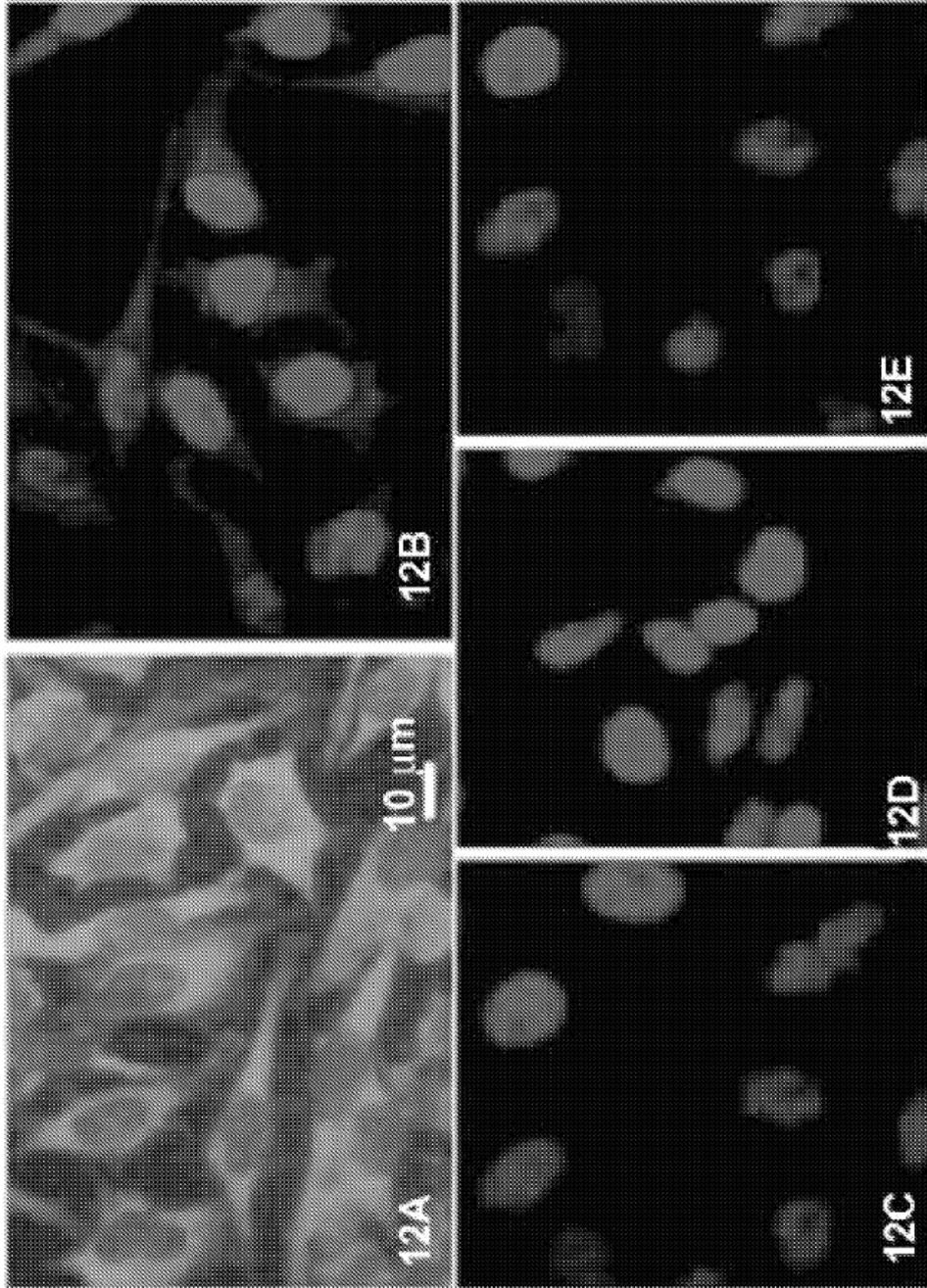


Fig. 13

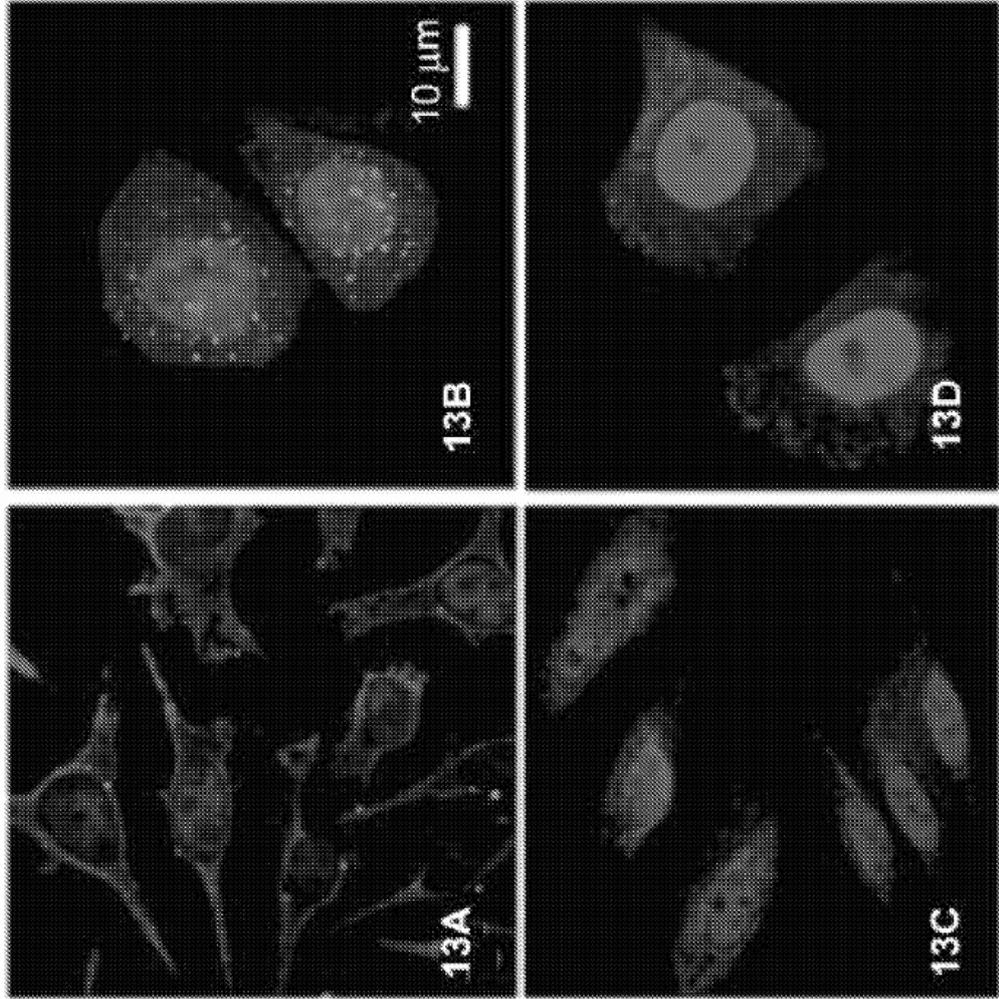


Fig. 14

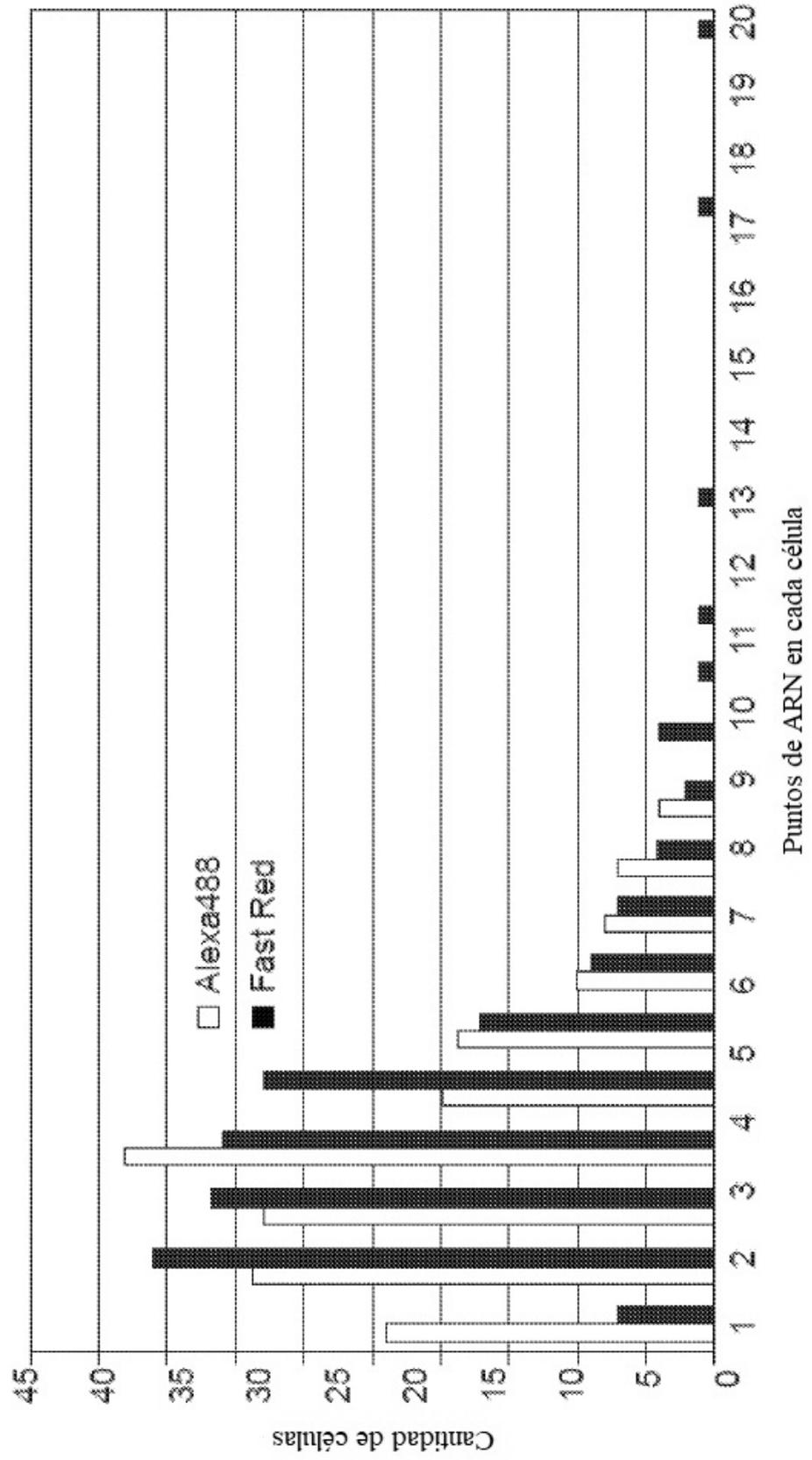


Fig. 15

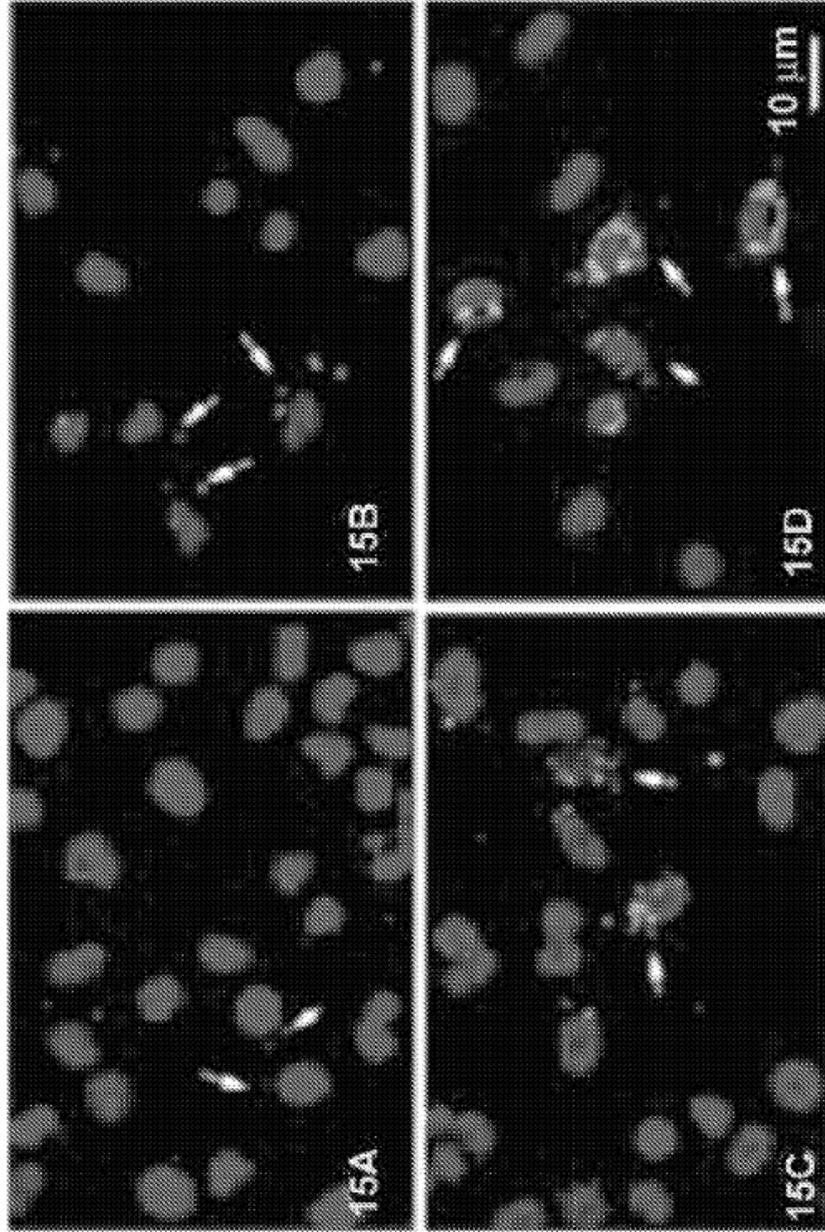


Fig. 16

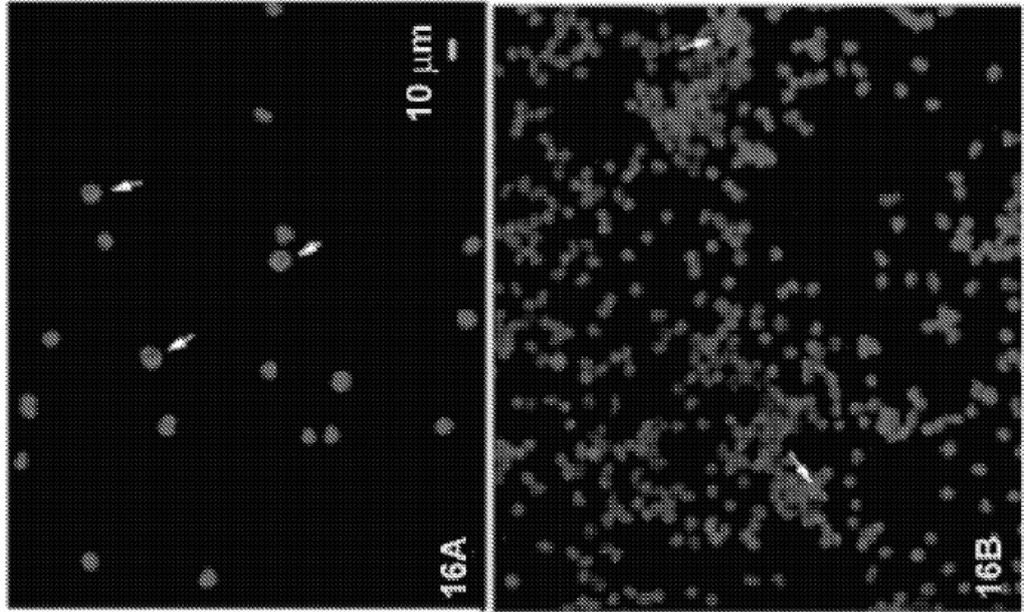


Fig. 17

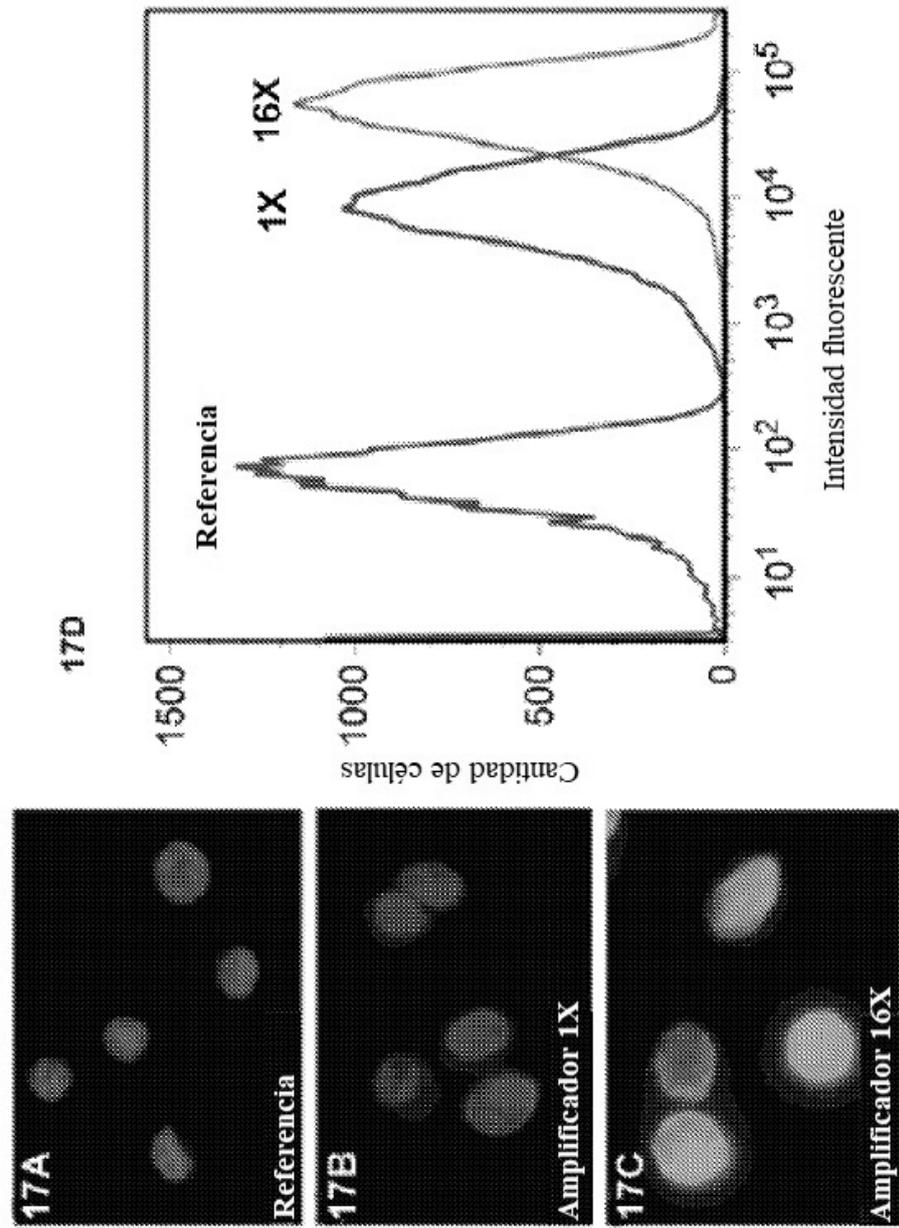


Fig. 18

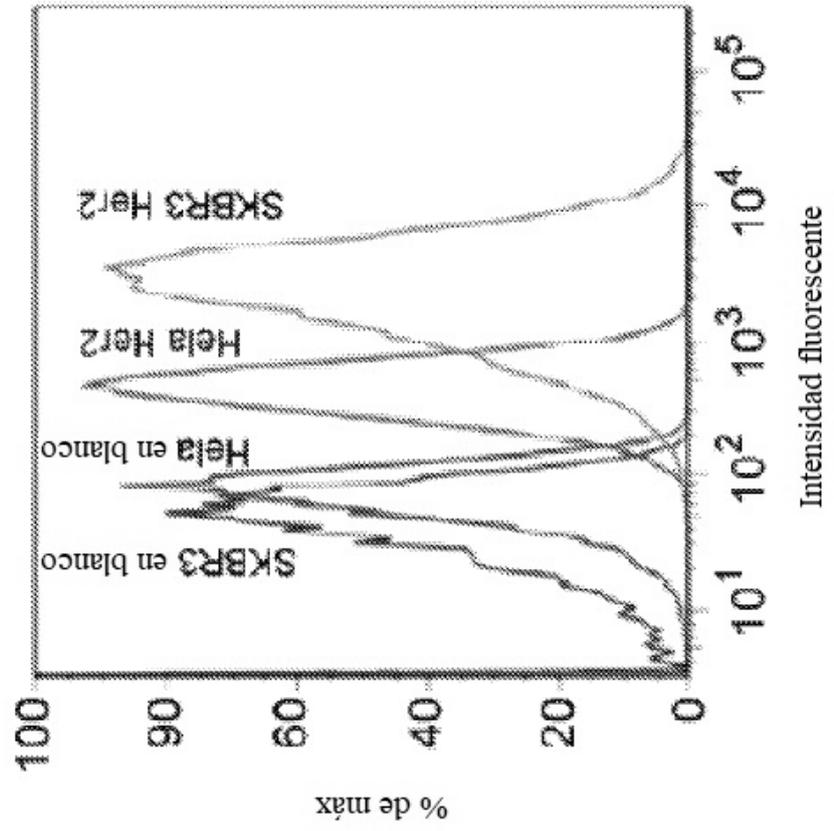


Fig. 19

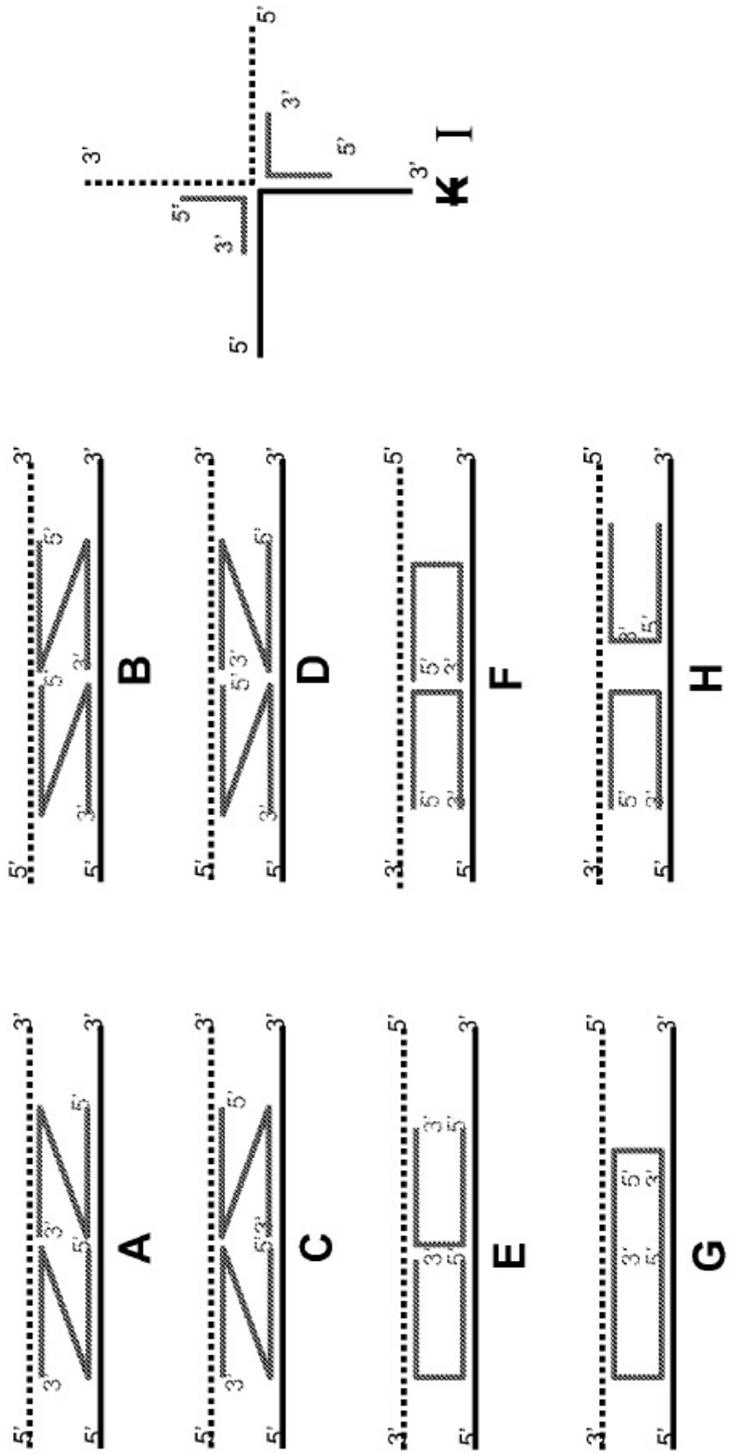


Fig. 20

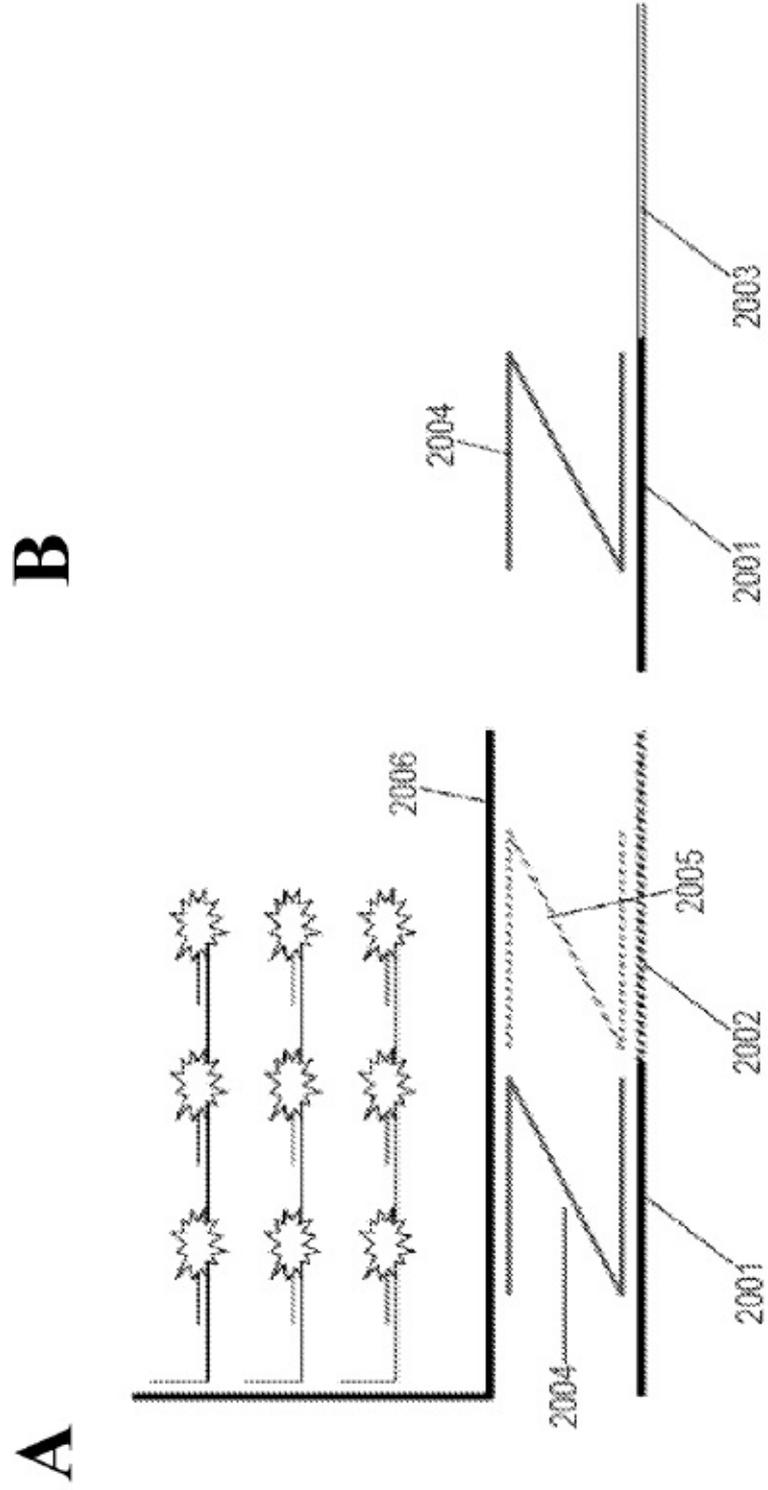


Fig. 21

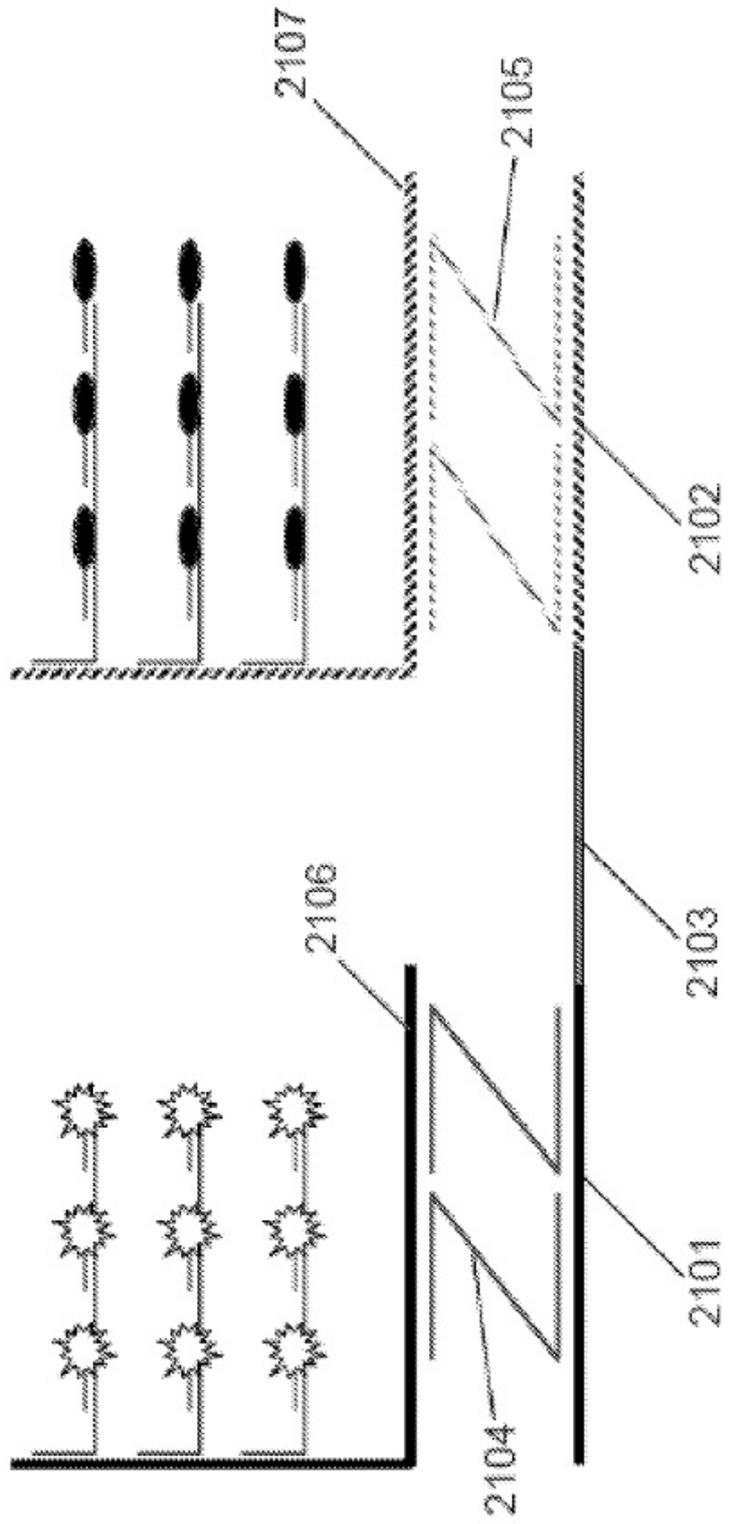


Fig. 22

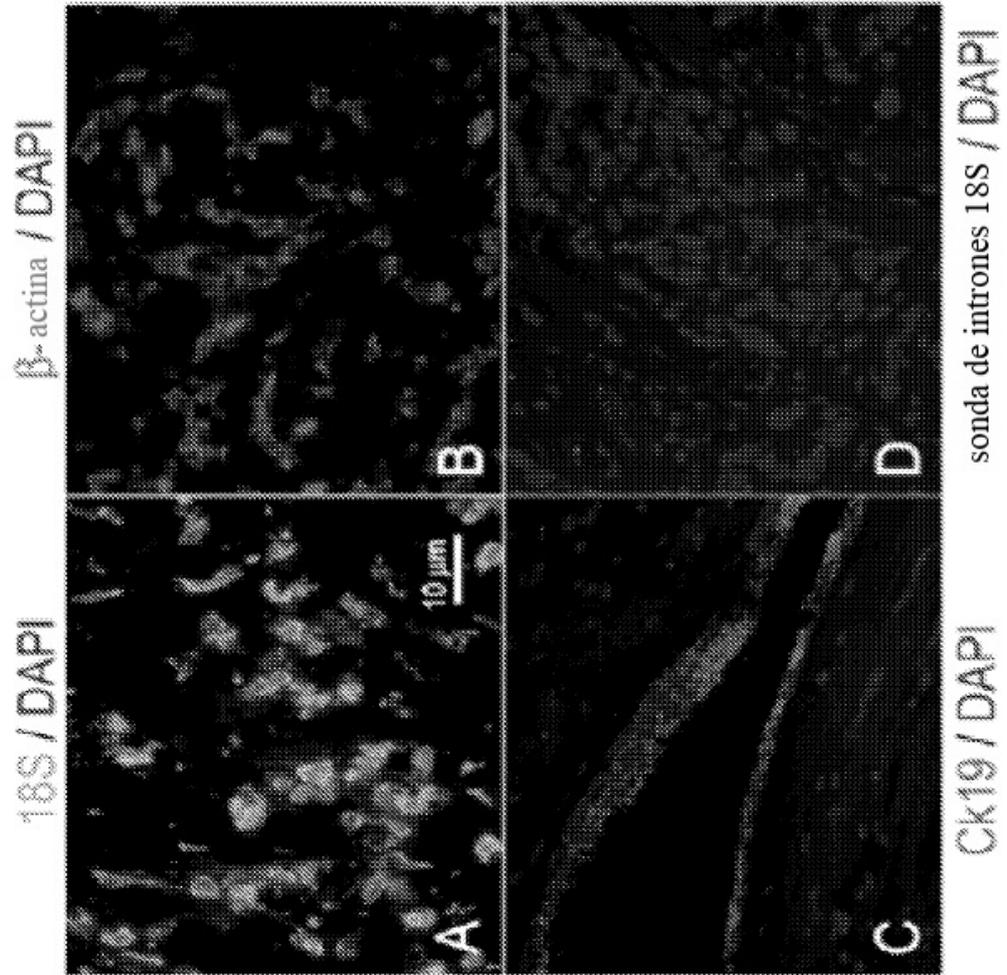


Fig. 23

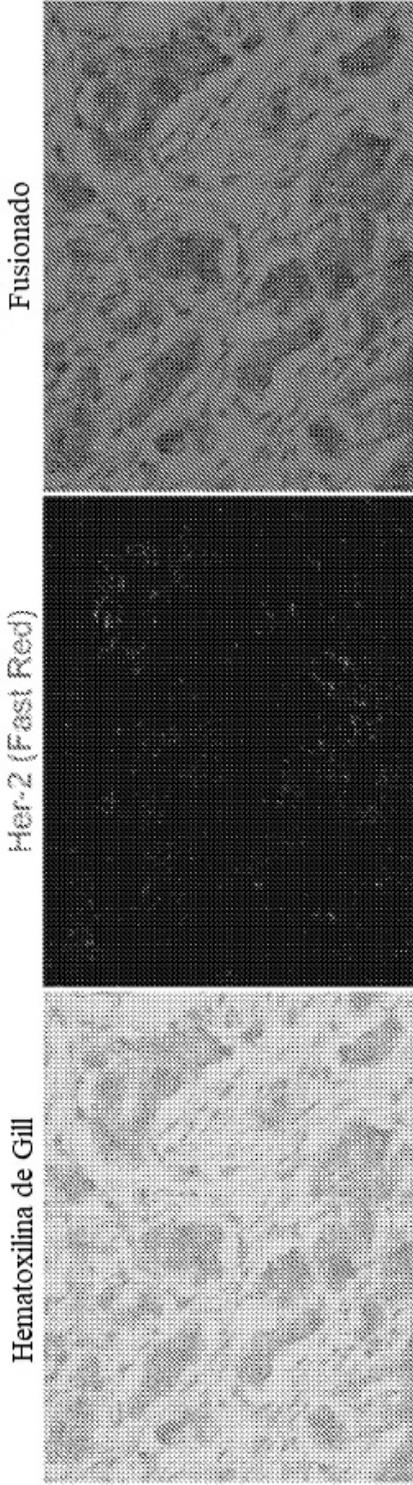


Fig. 24

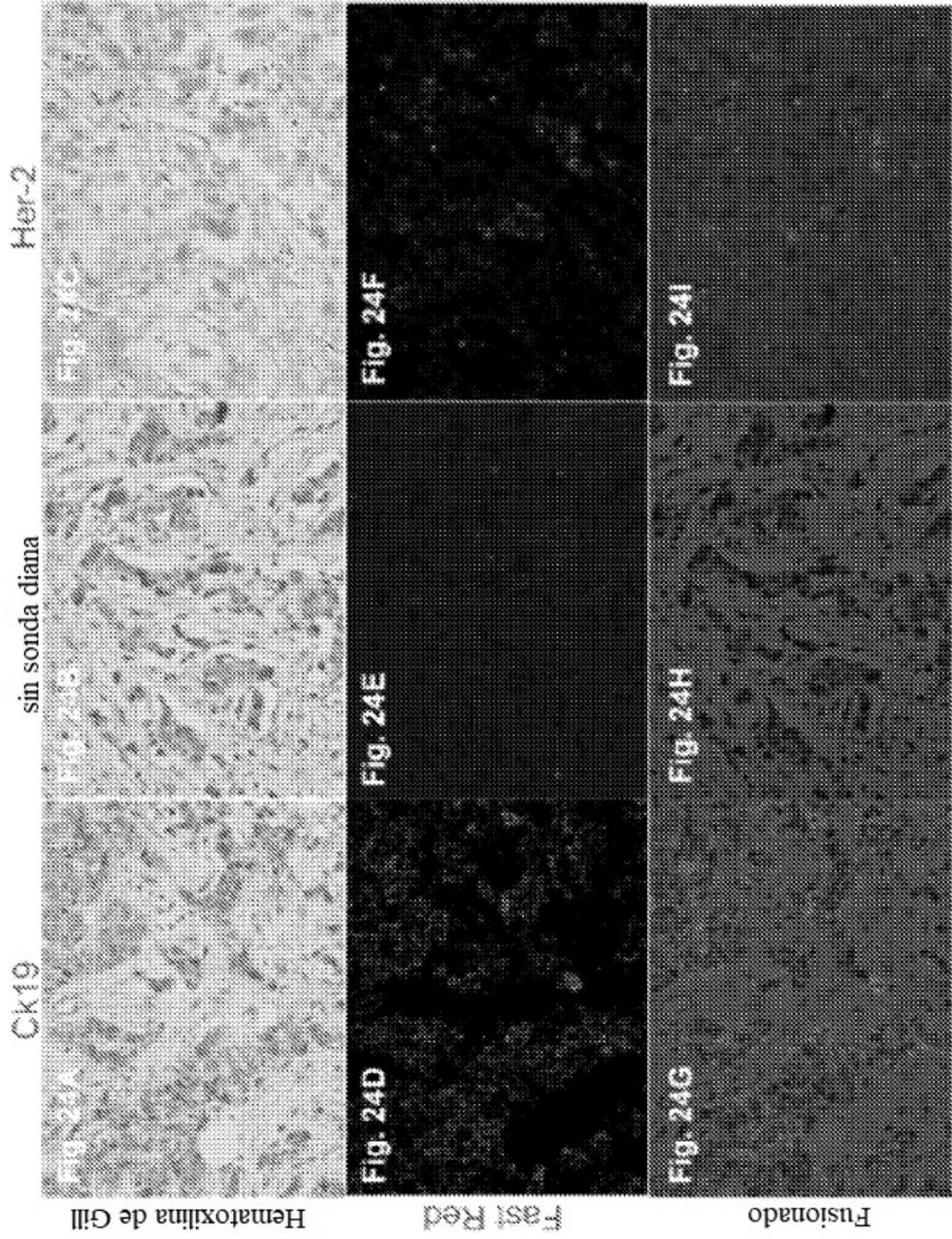


Fig. 25

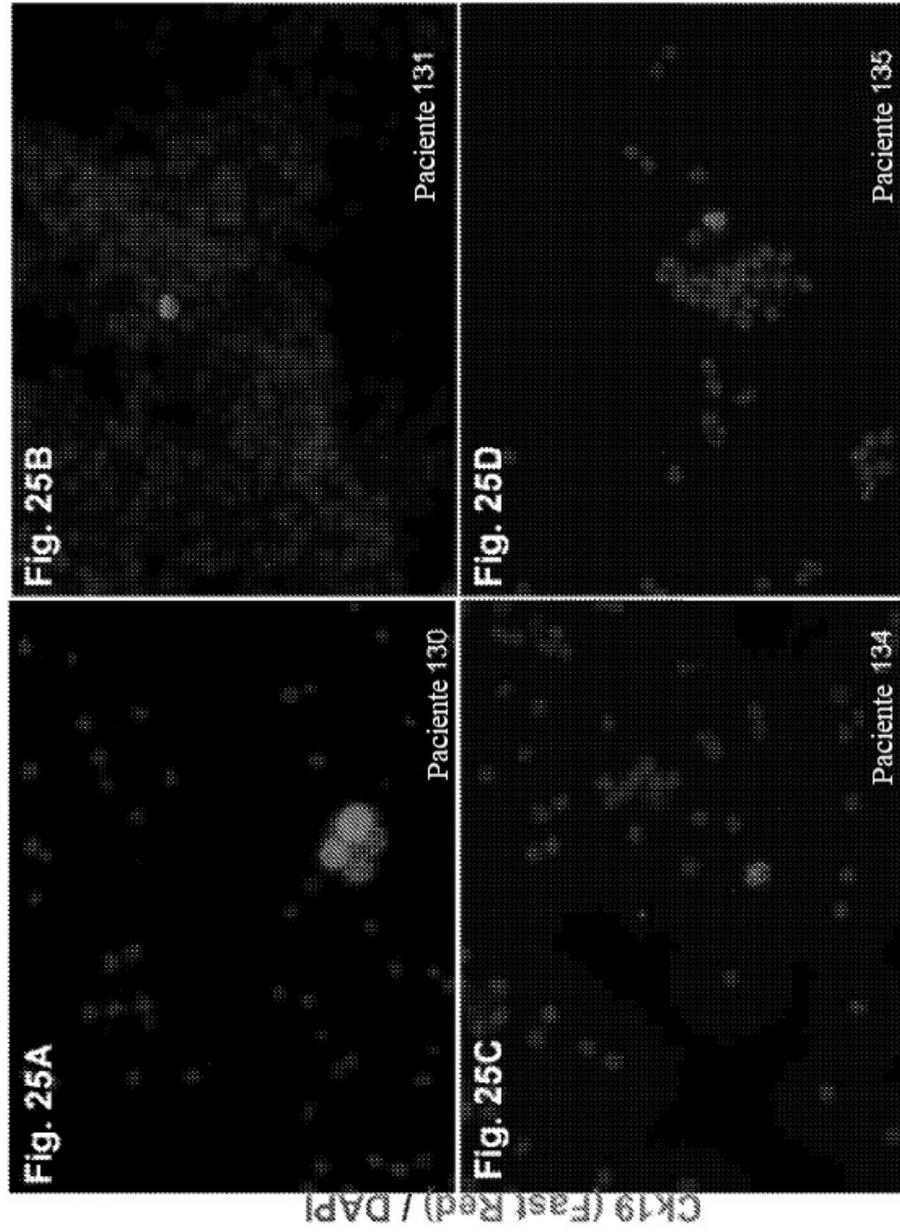
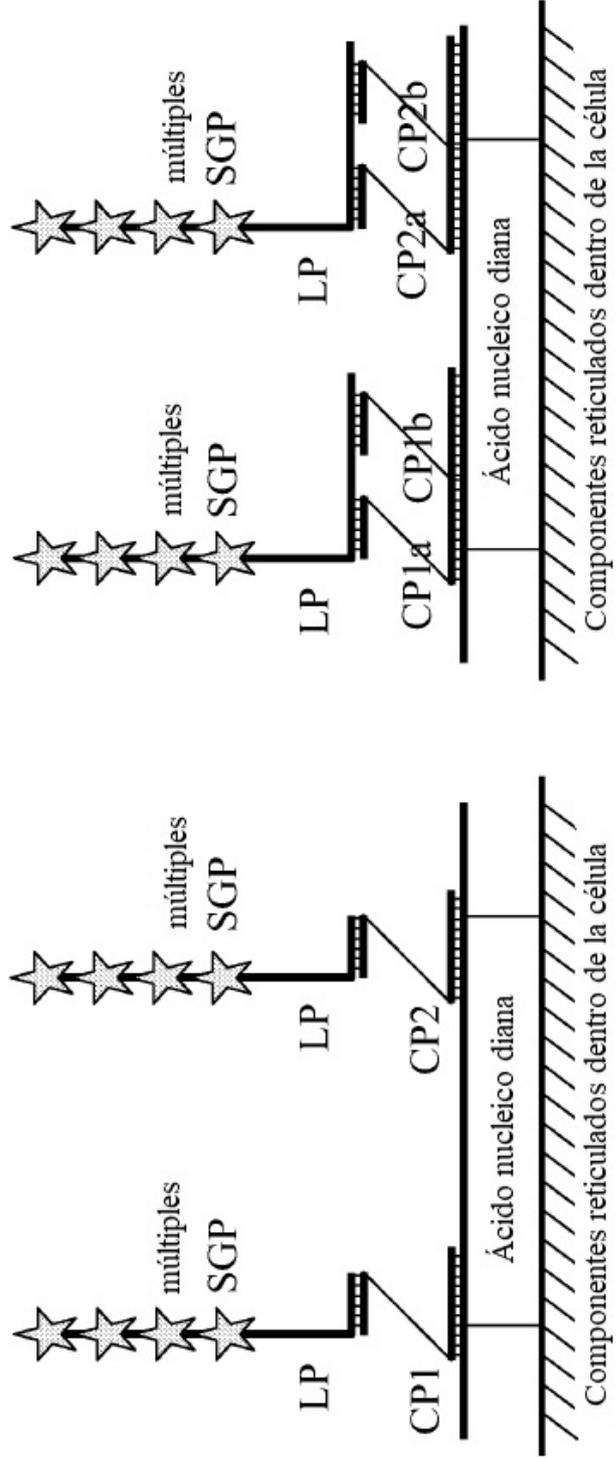


Fig.26



A

B

Fig.27

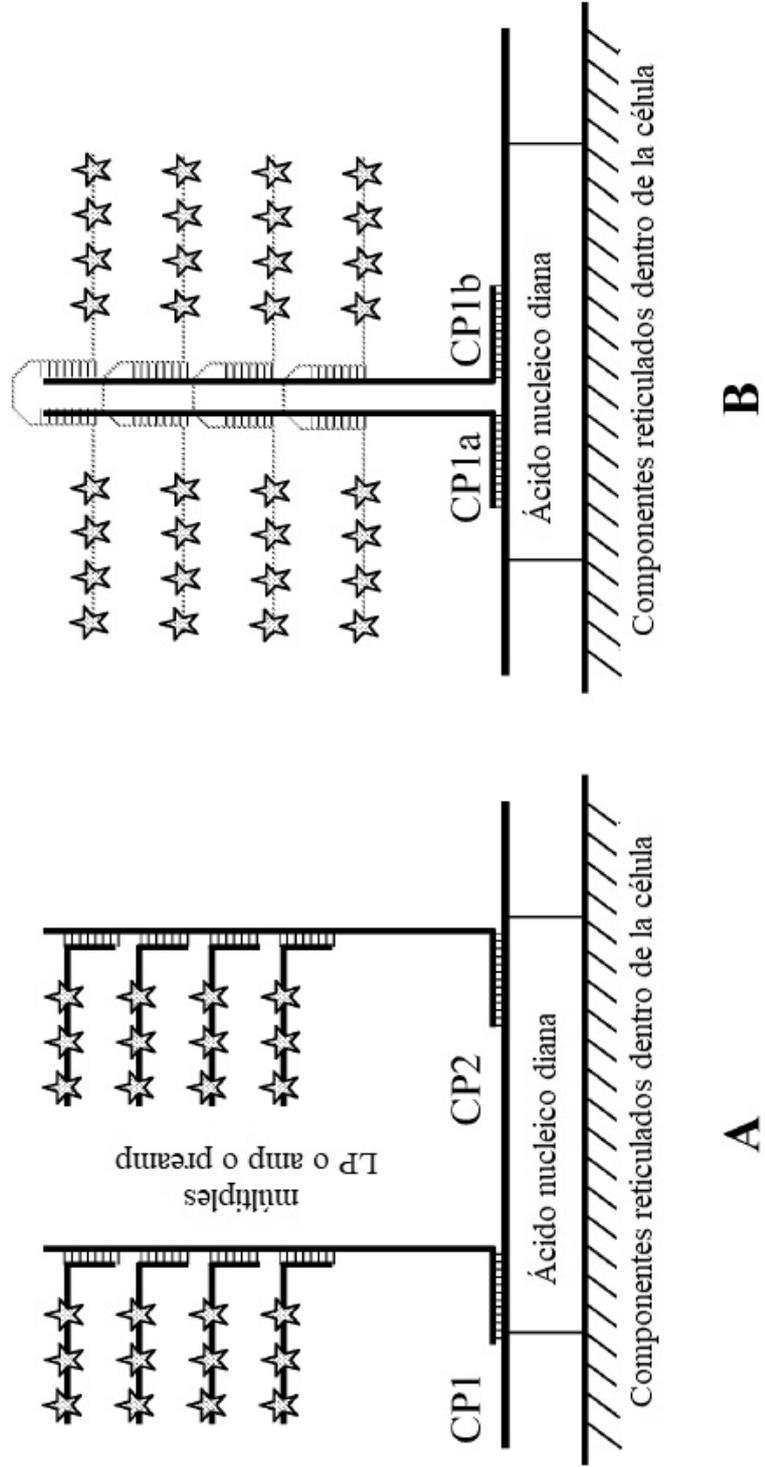


Fig. 28

- Marcadores epiteliales con alta especificidad (baja expresión de PBMC)

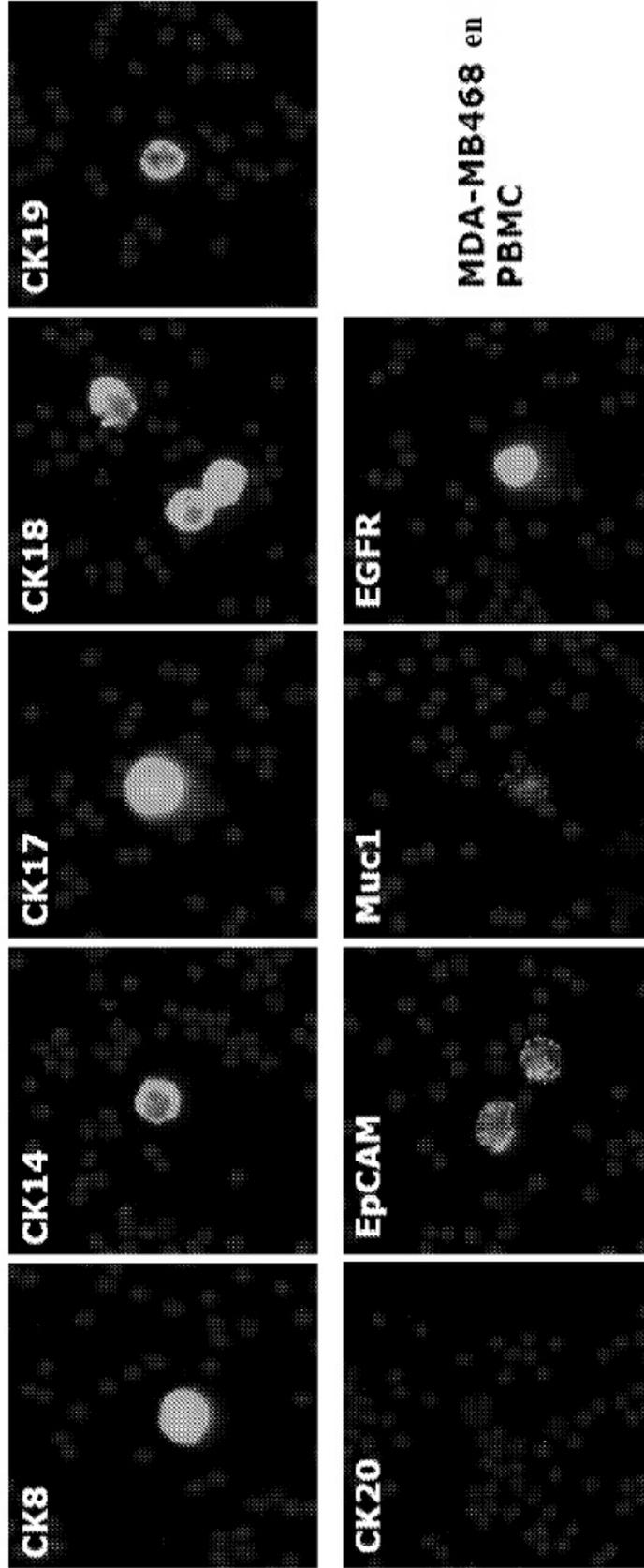


Fig. 29

- Marcadores de EMT con alta especificidad

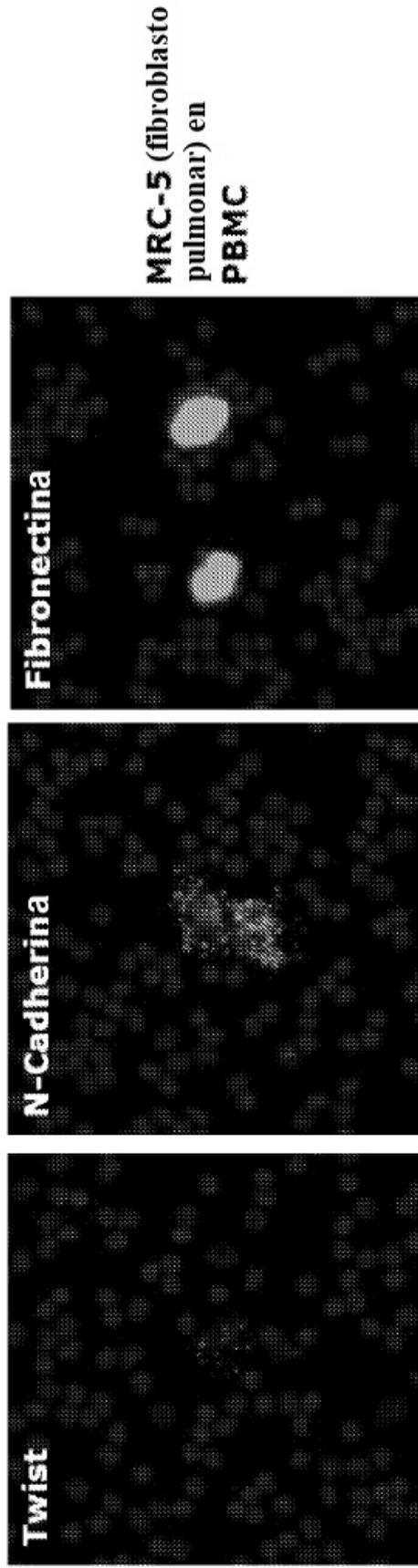
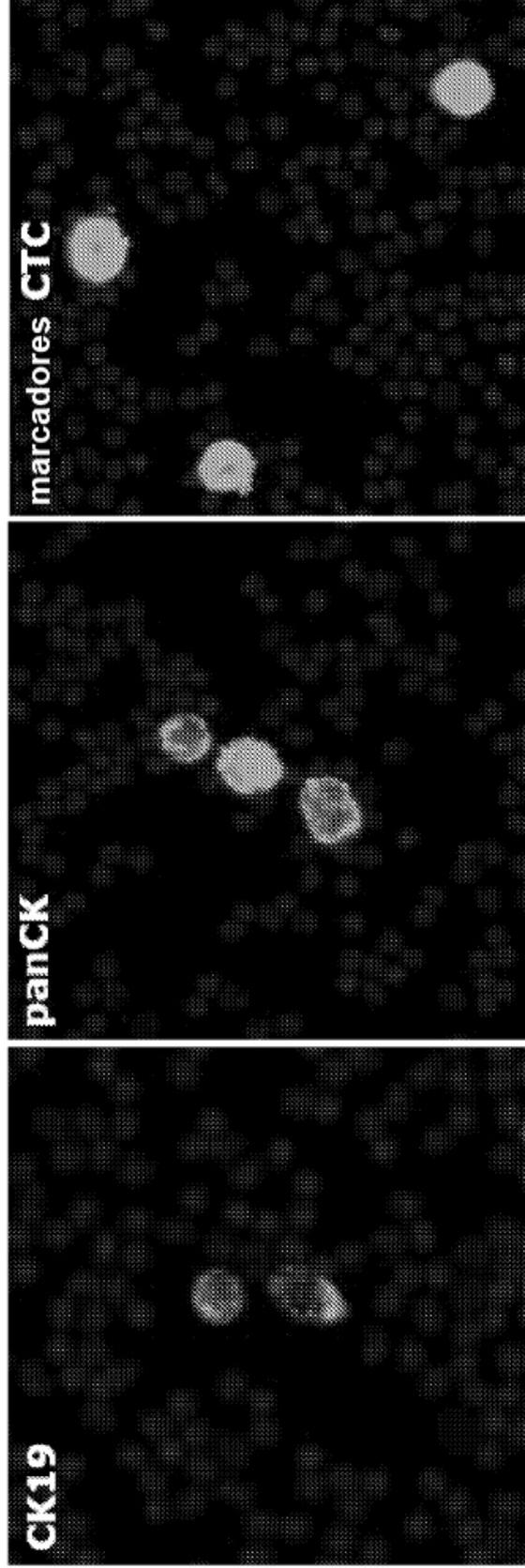


Fig. 30

Intensidad normalizada (en color)



panCK: CK8/18/19

marcadores CTC: CK8, K14, CK17, CK18, CK19, CK20, EpcAM, Muc1, Twist, N-Cadherina, Fibronectina