

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 745**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/29** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G06F 15/00** (2006.01)  
**G01N 21/55** (2014.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)  
**G06F 19/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2000 E 00932399 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 1183521**

54 Título: **Detección basada en aptámero**

30 Prioridad:

**14.05.1999 US 134330 P**  
**05.01.2000 US 174398 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.05.2014**

73 Titular/es:

**BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)**  
**415 SOUTH STREET**  
**WALTHAM, MA MASSACHUSETTS 02454-9110,**  
**US**

72 Inventor/es:

**STANTON, MARTIN;**  
**WENSINK, PIETER y**  
**STEWART, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 459 745 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Detección basada en aptámero

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a composiciones, sistemas y procedimientos para detectar especies moleculares usando ácidos nucleicos.

**Antecedentes de la invención**

10 Se han usado varios tipos de sistemas para detectar la presencia de una sustancia química o molécula concreta en una muestra compleja. Por ejemplo, los anticuerpos se usan para detectar la presencia de una proteína en una muestra, se han usado circuitos de micromatrices de ADN para identificar genes y la expresión génica del estudio. La mayoría de los sistemas de detección molecular existentes están diseñados para detectar la presencia de un único tipo o una única categoría de molécula diana. En el caso de detección de anticuerpos, los sistemas existentes están típicamente limitados a detectar únicamente una subpoblación de un tipo de molécula.

15 Recientemente se ha demostrado que aptámeros de ARN y ADN pueden sustituirse por los anticuerpos monoclonales en varias aplicaciones (Jayasena, "Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics." Clin. Chem., 45(9):1628 - 50, 1999; Morris et al., "High affinity ligands from in vitro selection: complex targets." Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(6):2902 - 7, 1998). El proceso de selección relativamente rápido de los aptámeros específicos y la barata síntesis convierte a los aptámeros en alternativas útiles a los anticuerpos monoclonales. Estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar fácilmente, manipular fácilmente y se pueden almacenar durante un largo tiempo. Estos beneficios hacen de los ácidos nucleicos herramientas tecnológicas más atractivas que sus homólogos de proteínas y anticuerpos. Adicionalmente, estas sondas de ácido nucleico también se pueden marcar con radioisótopos, biotina o marcadores fluorescentes, y se pueden usar para detectar dianas en condiciones de vacío. SELEX ha desarrollado un número creciente de aptámeros de ADN y ARN que reconocen sus ácidos no nucleicos diana y se han caracterizado (Gold et al., "Diversity of Oligonucleotide Functions," Annu. Rev. Biochem., 64:763 - 97, 1995; Bacher & Ellington. "Nucleic Acid Selection as a Tool for Drug Discovery," Drug Discovery Today, 3(6):265 - 273, 1998).

20 El documento WO 99/31275 que representa el estado de la técnica conforme al Artículo 54(3) EPC, divulga un biochip diagnóstico de ácido nucleico para la detección de una molécula diana en una mezcla de ensayo que comprende un soporte sólido al que un o más ligandos de ácido nucleico específicos están unidos de un modo definido espacialmente. En una realización, los ligandos se unen a una molécula pequeña que será desplazada por la molécula diana. Este desplazamiento se detecta mediante fluorescencia.

Osborne et al, "Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: Problems and prospects" Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 1, N° 1 June 1997, páginas 5 - 9, describe aptámeros marcados con fluoresceína inmovilizados en una superficie de cristal para generar señales dependientes de ligando.

35 Fang et al, "Designing a Novel Molecular Beacon for Surface-Immobilized DNA Hybridization Studies", J. Am. Chem. Soc. Vol. 121, N° 12, páginas 2921 - 2922, 31 March 1999, divulgan una baliza molecular que comprende un primer resto indicador unido a la primera porción del tallo y un Segundo resto indicador unido a la segunda porción del tallo, en la que la unión de la molécula de ácido nucleico Diana a la región del bucle rompe los enlaces de los pares de bases en la porción tallo.

40 El documento EP 0 826 780 A1 se refiere a una baliza molecular con una estructura de G-cuarteto que se despliega tras la hibridación en presencia de su secuencia de ácido nucleico complementaria.

Potyrailo et al, "Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors", Anal. Chem., vol. 70, 1998, páginas 3419 - 3425, divulgan aptámeros inmovilizados y marcados con fluorescencia.

**Sumario de la invención**

45 La invención se refiere a nuevas composiciones, sistemas y procedimientos para detectar de forma simultánea la presencia y la cantidad de uno o más compuestos diferentes en una muestra usando nuevas moléculas sensoras de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. Anteriormente se ha demostrado que los ácidos nucleicos son capaces de unirse específicamente con alta afinidad a moléculas diana no nucleotídicas, tales como proteínas, moléculas orgánicas pequeñas o moléculas inorgánicas. Estos ácidos nucleicos habitualmente se denominan aptámeros. Un aptámero puede ser un ARN o un ADN compuesto de nucleótidos de origen natural o modificados.

50 En las composiciones nuevas, los aptámeros convencionales se modifican mediante bioingeniería de forma que la unión de un aptámero modificado por bioingeniería a una molécula diana produzca un cambio en la conformación del aptámero modificado por bioingeniería. Adicionalmente, dos restos o grupos indicadores están incluidos en los aptámeros modificados por bioingeniería de forma que el cambio en la conformación del aptámero modificado por bioingeniería tenga como resultado un cambio detectable de una propiedad física de al menos uno de los grupos

indicadores). Estos aptámeros modificados por bioingeniería se denominan en el presente documento balizas de aptámeros.

Las balizas de aptámeros que tienen regiones de unión configuradas para unirse a diferentes moléculas diana se puede usar en varios procedimientos y sistemas de detección. Por ejemplo, las nuevas balizas de aptámeros se pueden usar en ensayos basados en solución o se pueden unir a un soporte sólido, por ejemplo a puntos predeterminados diferentes en una matriz uni o bidimensional, para usar en ensayos en base sólida. Las balizas de aptámero o matrices de balizas de aptámeros se exponen después a la muestra, de forma que las moléculas diana en la muestra se unen a sus respectivas balizas de aptámeros. La presencia de moléculas Diana unidas se puede detectar midiendo un cambio en una propiedad física del grupo indicador de la baliza de aptámero, por ejemplo observando un cambio en la eficiencia de la fluorescencia de la baliza de aptámero.

Para ayuda a analizar la muestra, los nuevos sistemas de detección pueden incluir un software de reconocimiento de patrones. El software compara el patrón de unión de la molécula diana correspondiente a la muestra desconocida con los patrones de unión correspondientes a compuestos conocidos. A partir de estas comparaciones, el software puede determinar la composición de la muestra o deducir la información sobre la fuente de la muestra.

Los sistemas se pueden usar para detectar la existencia de compuestos característicos o "huellas moleculares" asociados con determinadas sustancias químicas o afecciones. Por ejemplo, los sistemas se pueden usar para analizar fármacos humanos detectando la presencia de metabolitos de fármacos concretos. Los sistemas también se pueden usar para deducir la existencia de una enfermedad (p. ej., cáncer) detectando la presencia de compuestos asociados con el estado de enfermedad o para monitorizar la contaminación detectando compuestos característicos de la descarga de determinados contaminantes. También son posibles otras numerosas aplicaciones.

En general, la invención se refiere a una baliza de aptámero como se define en la reivindicación 1 que se une a una molécula diana de ácido nucleico y que incluye un oligonucleótido que incluye una porción de bucle, un primer segmento y un segundo segmento complementario del primer segmento, en el que el primero y el segundo segmentos forman una porción de tallo cuando se hibridan; una región de unión formada por el oligonucleótido y configurada para unirse a la molécula diana de ácido nucleico; un primer resto indicador, por ejemplo un fluoróforo, unido al primer segmento; y un segundo resto indicador, por ejemplo un inactivador químico, unido al segundo segmento, en el que los restos indicadores primero y segundo interaccionan para producir una señal detectable cuando la distancia entre ellos se modifica; en el que la unión de la molécula diana a la región de unión rompe los enlaces de los pares de bases en la porción de tallo, lo que produce un cambio en la conformación de la baliza de aptámero que separa los segmentos primero y segundo de modo que alteran la distancia entre los restos indicadores primero y segundo y producen una señal detectable.

Un cambio conformacional en una baliza de aptámero es una alteración en la estructura secundaria y/o terciaria del oligonucleótido que forma la baliza de aptámero. Un cambio conformacional típicamente tiene como resultado la adición y/o deleción de las interacciones de apareamiento de bases entre las formas alteras de la baliza de aptámero.

En estas nuevas balizas de aptámero, cuando el primer resto indicador es un fluoróforo y el segundo resto indicador es un inactivador químico, el inactivador inactiva el fluoróforo cuando los segmentos primero y segundo hibridan para formar la porción de tallo y en el que la unión de una molécula diana a la región de unión rompe las uniones de los pares de bases en la porción de tallo, lo que hace que los segmentos primero y segundo se separen y el fluoróforo se separe del grupo químico, de modo que finaliza la inactivación y se permite que el fluoróforo emita una fluorescencia detectable.

En estas balizas de aptámero, la región de unión se puede localizar completa o parcialmente dentro de la porción de bucle, la porción de tallo o al menos parcialmente en ambas. Además, los restos indicadores primero y segundo pueden ser una enzima y un correspondiente ligando y los segmentos primero y segundo pueden incluir 4, 5, 6 o 7 nucleótidos cada uno.

La invención también se refiere a una baliza de aptámero como se define en la reivindicación 7 que se une a una molécula diana de ácido nucleico y que incluye un oligonucleótido que incluye un primer segmento, un segundo segmento y un tercer segmento localizados entre los segmentos primero y segundo, en el que los segmentos primero y segundo forman un complejo, por ejemplo un dúplex híbrido u otra estructura secundaria o terciaria, cuando la baliza de aptámero no está unida a la molécula diana: una región de unión formada por la baliza de aptámero al contactar con las moléculas diana con un primer resto indicador unido al primer segmento; y un segundo resto indicador unido al segundo segmento, en el que los restos indicadores primero y segundo interaccionan para producir una señal detectable cuando la distancia entre ellos se modifica; en el que la unión de la molécula diana a la región de unión rompe los enlaces de los pares de bases en el complejo produciendo un cambio de conformación de la baliza de aptámero que altera la distancia entre los restos indicadores primero y segundo, y produciendo una señal detectable.

La invención además se refiere a una baliza de aptámero como se define en la reivindicación 8 que incluye un primer segmento, un segundo segmento, un tercer segmento y un cuarto segmento.

En estas balizas de aptámero, el primer resto indicador puede ser un resto absorbente de energía y el segundo resto indicador puede ser un resto emisor de fluorescencia, de forma que cuando los restos indicadores primero y segundo están lo bastante cercados, el resto absorbente permite una transferencia de energía entre los restos, de modo que permite que el resto emisor emita fluorescencia; y en el que la unión de una molécula diana a la región hace que los segmentos primero y segundo hibriden.

En otro aspecto, la invención se refiere a un dispositivo para detectar de forma simultánea la presencia de una pluralidad de moléculas diana de ácido no nucleico diferentes en una muestra, como se define en la reivindicación 11. El dispositivo incluye: un soporte sólido; y una pluralidad de diferentes balizas de aptámero unidas al soporte, teniendo cada baliza de aptámero un primer extremo unido al soporte, y una región de unión que se une a una molécula diana de ácido no nucleico, en el que las regiones de unión de las diferentes balizas de aptámero se unen a diferentes moléculas diana. En estos dispositivos, el soporte sólido puede ser una superficie de cristal a la que los primeros extremos de las balizas de aptámero están unidas covalentemente. Además, el soporte sólido puede ser una superficie plana y las balizas de aptámero se pueden distribuir sobre la superficie plana en una matriz bidimensional. Las manchas de las balizas de aptámero idénticas se pueden localizar en diferentes puntos en la matriz bidimensional.

La región de unión de al menos una de las balizas de aptámero en el dispositivo se puede configurar para unirse a una molécula diana de ácido no nucleico seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un esteroide y una molécula inorgánica. Las balizas de aptámero pueden comprender ARN, ADN, ARN modificado, ARN modificado o una combinación de los mismos. Además, cada baliza de aptámero puede comprender un grupo indicador, tal como un fluoróforo, para señalización de unión de una molécula diana a la región de unión.

La invención se refiere también a un procedimiento de detectar la presencia o ausencia de una o más moléculas diana diferentes en una muestra como se define en la reivindicación 18, obteniendo una pluralidad de las nuevas balizas de aptámero; poner en contacto la muestra con las balizas de aptámero de modo que cualquier molécula diana en la muestra se puedan unir a las correspondientes regiones de unión de las balizas de aptámero; y detectar la presencia de moléculas diana unidas a las balizas de aptámero. Las balizas de aptámero pueden estar en un líquido o se pueden unir a un soporte sólido, tal como una partícula o una placa. En algunas realizaciones, las balizas de aptámero emiten radiación fluorescente cuando son excitadas por ondas evanescentes.

En este procedimiento, diferentes manchas, incluyendo cada mancha una pluralidad de balizas de aptámero idénticas, se pueden distribuir sobre el soporte sólido en una matriz predeterminada, y el procedimiento puede además incluir comparar un patrón de fluorescencia de la muestra con patrones de fluorescencia conocidos, por ejemplo con un programa informático, dispuesto en un medio legible por ordenador, que incluye instrucciones para hacer que un procesador compare el patrón de fluorescencia de la muestra con una biblioteca de patrones de fluorescencia conocidos; y seleccionar la combinación de patrones de fluorescencia conocidos que se acerque más al patrón de fluorescencia de la muestra.

La etapa de detección también puede incluir detectar un cambio en las frecuencias de emisión de Raman de una baliza de aptámeros que se produce cuando una molécula diana se une a la baliza de aptámero.

También se describe un programa informático dispuesto en un medio legible por ordenador, para analizar los resultados de un ensayo que determine la composición de una muestra y deduzca la presencia o ausencia de condiciones anormales conocidas, incluyendo el programa informático instrucciones para hacer que un procesador: comparando los resultados del ensayo, por ejemplo una imagen, con una biblioteca de resultados conocidos correspondientes a someter a las muestras de composición conocida al ensayo; seleccionando una combinación de resultados conocidos que se acercan más a los resultados del ensayo; comparando cualquier desviación entre el resultado de la muestra y la combinación de resultados conocidos con una biblioteca de desviaciones conocidas, estando las desviaciones causadas por condiciones anormales conocidas; y deduciendo la presencia o ausencia de condiciones anormales conocidas. Por ejemplo, las condiciones anormales conocidas pueden incluir la presencia de compuestos anormales en la muestra y la presencia de compuestos normales en cantidades anormales.

También se describe un procedimiento para analizar el resultado de un ensayo que determine la composición de una muestra y deduzca la presencia o ausencia de condiciones anormales conocidas comparando el resultado del ensayo con una biblioteca de resultados conocidos correspondiente a someter a las muestras de composición conocida al ensayo; seleccionar una combinación de resultados conocidos que se acerquen más a los resultados del ensayo: comparando cualquier desviación entre los resultados de la muestra y la combinación de resultados conocidos con una biblioteca de desviaciones conocidas, estando las desviaciones conocidas causadas por condiciones anormales conocidas; y deduciendo la presencia o ausencia de condiciones anormales conocidas.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un dispositivo para detectar la presencia de una molécula diana en una muestra como se define en la reivindicación 28. El dispositivo incluye un soporte sólido; y una pluralidad de diferentes balizas de aptámero unidas al soporte, teniendo cada baliza de aptámero un primer extremo unido al soporte, la región de unión que se une a un enantiómero específico de la molécula diana o a un sitio de unión específico de la diana, en el que las regiones de unión de las diferentes balizas de aptámero se unen a diferentes enantiómeros de la molécula diana.

Por ejemplo, la diana puede ser un antígeno y los diferentes sitios de unión pueden ser diferentes epítomos del antígeno o la diana puede ser una bacteria y los diferentes sitios de unión pueden ser diferentes proteínas de superficie de las bacterias.

5 La invención se refiere además a un sistema para detectar de forma simultánea la presencia de una pluralidad de diferentes moléculas diana de ácido no nucleico en una muestra, como se define en la reivindicación 31. El sistema incluye un soporte sólido (opcional); una pluralidad de diferentes balizas de aptámero diferentes unidas opcionalmente al soporte, teniendo cada baliza de aptámero un primer extremo unido al soporte, una región de unión que se une a una molécula diana de ácido no nucleico específica, uniéndose las regiones de unión de diferentes balizas de aptámero a diferentes moléculas diana; y un sistema de detección que detecta la presencia  
10 diferentes diana unidas a balizas de aptámero, incluyendo el sistema de detección una fuente de radiación, por ejemplo un láser, y un detector. El sistema puede incluir además un analizador para determinar la presencia de moléculas diana en la muestra en base a los resultados del sistema de detección. El analizador también puede incluir un procesador informático programado para comparar los resultados del sistema de detección con una biblioteca de resultados conocidos correspondientes a la exposición de muestras de composición conocida a las  
15 balizas de aptámero sobre el soporte sólido; y seleccionar una combinación de resultados conocidos que se acerquen más a los resultados del ensayo. El procesador informático puede además programarse para comparar cualquier desviación entre los resultados del sistema de detección y la combinación de resultados conocidos con una biblioteca de desviaciones conocidas, estando las desviaciones conocidas causadas por condiciones anormales conocidas; y deducir la presencia o ausencia de condiciones anormales conocidas.

20 En otro aspecto más, la invención refiere a un sistema para detectar de forma simultánea la presencia o ausencia de una o más moléculas diana diferentes en una muestra, como se define en la reivindicación 38, usando una pluralidad de diferentes especies de balizas de aptámero, en las que cada especie de balizas de aptámero tiene un grupo indicador diferente, una región de unión que se une a una molécula diana de ácido no nucleico específica, y en la que las regiones de unión de diferentes balizas de aptámero se unen a diferentes moléculas diana; y un sistema de detección que detecta la presencia de moléculas diana unidas a balizas de aptámero, siendo capaz el sistema de detección de detectar los diferentes grupos indicadores. El procedimiento también se puede llevar a cabo con una pluralidad de balizas de aptámero idénticas. Por ejemplo, cada aptámero puede incluir un indicador, tal como una baliza molecular, que cambia las propiedades de fluorescencia tras la unión a la diana. Cada especie de baliza de aptámero se puede marcar con un pigmento fluorescente diferente para permitir la detección simultánea de  
25 múltiples moléculas diana, por ejemplo una especie podría marcarse con fluoresceína y otra con rodamina. La longitud de onda de excitación de fluorescencia (o espectro) se puede variar y/o el espectro de emisión se puede observar para detectar de forma simultánea la presencia de múltiples dianas.

La medición de la fluorescencia se puede realizar con una serie de instrumentos diferentes, incluyendo espectrofotómetros de fluorescencia estándar o en un volumen pequeño usando una fuente de alta intensidad, tal como un láser, óptica de recolección de luz de alta eficiencia, tal como un objetivo de microscopio de apertura numérica alta y un detector de ruidos bajos de alta eficiencia, tal como un tubo multiplicador de foto, u fotodiodo o una cámara CCD.  
35

El procedimiento puede incluir además un programa de ordenador que incluye instrucciones para hacer que el procesador compare la emisión de fluorescencia medida o el espectro de excitación con el espectro conocido de cada uno de los pigmentos individuales para determinar cuantitativamente la concentración de cada una de las moléculas diana en la solución.  
40

Diferentes aspectos de la invención pueden incluir una o más de las siguientes ventajas. Los sistemas de detección basados en balizas de aptámero permiten la detección de una pluralidad de diferentes compuestos simultáneamente o detección de alta sensibilidad de una única diana en una pluralidad de modos diferentes. Al contrario que los anticuerpos, que se seleccionan en un organismo, los aptámeros se pueden seleccionar *in vitro*, por ejemplo en un tubo de ensayo. Esto permite la detección de moléculas diana que son tóxicas o inmunológicamente inertes. Al contrario que los aptámeros estándar, las nuevas balizas de aptámero transducen la interacción de la unión aptámero;diana en un cambio detectable en las propiedades físicas de la baliza de aptámero.  
45

Además, las balizas de aptámero en los sistemas de detección tienen afinidades elevadas por sus moléculas diana, lo que permite una detección ultrasensible. Como resultado, los sistemas son altamente específicos y pueden distinguir moléculas que difieren en tan poco como un único grupo metilo o hidroxilo.  
50

Los sistemas también permiten un rápido análisis de una muestra (tan rápidamente como unos minutos), lo que facilita la detección de compuestos inestables. Además, los reactivos usados en el ensayo son poco caros y la química implicada en la realización del ensayo se automatiza automáticamente.

55 Los sistemas de detección se pueden usar en diversas aplicaciones, incluyendo ensayos de fármacos, ensayos de sensibilidad alta para detectar la presencia de bacterias o antígenos, monitorización de la contaminación y análisis de la presencia o ausencia de una enfermedad.

A menos que se defina en contra, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen

el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, tendrá prioridad. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

- 10 Las figuras 1A y 1B son esquemas que ilustran un procedimiento para unir una baliza de aptámero a cristal.
- La Fig. 2 es un esquema que ilustra una estructura de baliza de aptámero que se puede unir a cristal usando el procedimiento mostrado en la Fig. 1.
- Las figuras 3A-3D son esquemas que ilustran dos variaciones de un sistema indicador a base de fluorescencia para la señalización de la unión de una molécula diana a una baliza de aptámero.
- 15 Las figuras 4A-4D son esquemas que ilustran dos variaciones de un sistema indicador a base de fluorescencia alternativo para la señalización de la unión de una molécula diana a una baliza de aptámero.
- La Figura 5 es un esquema que ilustra la creación de ondas evanescentes en un límite de reflexión interno total.
- 20 La Figura 6 es un esquema de un sistema de detección para detectar la presencia de moléculas diana unidas a balizas de aptámeros.
- La Figura 7 es un esquema de un prisma y un cubreobjetos del sistema de detección de la Figura 6;
- La Figura 8 es un esquema de un sistema de detección alternativo para detectar la presencia de moléculas diana unidas a balizas de aptámero.
- 25 La Figura 9A es un esquema que ilustra una estrategia de detección de baliza de aptámero de dos partes que usa dos ácidos nucleicos diferentes configurados para unirse a diferentes sitios de unión en una molécula diana.
- La Figura 9B es un esquema que ilustra una estrategia alternativa de detección de baliza de aptámero de dos partes que usa dos ácidos nucleicos diferentes configurados para unirse a diferentes sitios de unión en una molécula diana.
- 30 La Figura 10A es un esquema de una matriz de balizas de aptámero.
- La Figura 10B es un esquema de una imagen que muestra fluorescencia en la matriz de balizas de aptámero de la Figura 9A tras la exposición de la matriz a una muestra.
- Las figuras 11A y 11B son diagramas de flujo de un procedimiento para detectar patrones en la salida de un sistema de detección.
- 35 La Fig. 12 es una ilustración esquemática de un sistema de detección para usar en un procedimiento de detección basado en solución.
- Las figuras 13A-D son una serie de diagramas esquemáticos de una baliza de aptámero de trombina en varias conformaciones.
- 40 La Figura 14 es una representación de un gel de electroforesis que muestra varias balizas de aptámero con y sin trombina.
- La Figura 1 es un gráfico que muestra el desplazamiento de una baliza de aptámero radiomarcada (G15D5d) con balizas de aptámero sin marcar.
- La Figura 16 es un gráfico que muestra la intensidad de la fluorescencia de la baliza de aptámero G 15D4dMB en tampón de unión a trombina (TBB) como función de la concentración de trombina.
- 45 La Figura 17 es un gráfico que muestra la emisión de fluorescencia de varias balizas de aptámero en tampón TE función de la concentración de trombina.
- La Figura 18 es un gráfico que muestra la emisión de fluorescencia de la baliza de aptámero G15D5dSP como función de la concentración de tampón TE y TBB.

La Figura 19 es un gráfico que muestra la emisión de fluorescencia de la baliza de aptámero G15D5dMP en tampón TE como función de la concentración del oligonucleótido complementario G15D5rev (hebra antisentido).

5 La Figura 20 es un gráfico que muestra la emisión de fluorescencia de la baliza de aptámero G15D5ndMB como función de la concentración de tampón TBB.

La Figura 21 es un gráfico que muestra el efecto de la trombina y el factor IX sobre la fluorescencia de la baliza de aptámero G15D5dMB en tampón TE.

La Figura 22 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de magnesio de la fluorescencia de la baliza de aptámero G15D5dMB en tampón TE.

## 10 **Descripción detallada**

Las balizas de aptámero son ácidos nucleicos que se han modificado mediante bioingeniería para sufrir un cambio conformacional y, por tanto, un cambio detectable en propiedades físicas, tras la interacción baliza de aptámero:diana. Estas balizas de aptámero se pueden modificar mediante bioingeniería con respecto a los aptámeros que se han seleccionado usando técnicas de selección de aptámeros bien conocidas. Las balizas de aptámero se pueden usar en un sistema de detección basada en solución o un sistema de detección basado en sólido, por ejemplo de matriz.

Los sistemas de detección de solución a base de baliza de aptámero incluyen balizas de aptámero configuradas para unirse a moléculas diana específicas y un sistema de detección. El sistema de detección detecta la unión de moléculas diana a balizas de aptámero mediante monitorización de un cambio en una o más propiedades físicas, por ejemplo un cambio en la eficiencia de la fluorescencia, de las balizas de aptámero.

Los sistemas de detección de matriz a base de baliza de aptámero incluyen balizas de aptámero configuradas para unirse a moléculas diana específicas, un sustrato y un sistema de detección. En estos sistemas, las balizas de aptámero se unen al sustrato, por ejemplo en una matriz uni o bidimensional. El sistema de detección detecta la unión de moléculas diana a balizas de aptámero mediante monitorización de un cambio en una o más propiedades físicas, por ejemplo un cambio en la eficiencia de la fluorescencia, de las balizas de aptámero, tal como la eficiencia de fluorescencia de los grupos indicadores de fluorescencia, un cambio en las emisiones de Raman o un desplazamiento en las condiciones necesarias para activar la resonancia en plasmón superficial.

Se pueden usar el reconocimiento de patrones y el software de análisis para comparar los resultados del sistema de detección con los resultados causados por compuestos conocidos o muestras. A partir de estas comparaciones, el software puede determinar, por ejemplo, información sobre la composición de la muestra o la condición de la fuente de la muestra.

### Selección de aptámeros

Los aptámeros configurados para unirse a moléculas diana específicas se pueden seleccionar mediante, por ejemplo, la síntesis de una población heterogénea inicial de oligonucleótidos y, después, seleccionar oligonucleótidos dentro de la población que se unen estrechamente a una molécula diana concreta. Una vez que se ha identificado un aptámero que se une a una molécula diana concreta, se puede replicar usando varias técnicas conocidas en las técnicas biológicas y de otros tipos, por ejemplo clonación y amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de transcripción.

La síntesis de una población heterogénea de oligonucleótidos y la selección de aptámeros dentro de dicha población se pueden conseguir usando un procedimiento conocido como Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial o SELEX. El procedimiento SELEX se describe en, por ejemplo, Gold et al., las patentes de EE.UU. N° 5.270.163 y 5.567.588; Fitzwater et al., "A SELEX Primer," *Methods in Enzymology*, 267:275 - 301 (1996); y en Ellington y Szostak, "In Vitro Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands," *Nature*, 346:818 - 22. En resumen, una población de oligómero de ADN heterogéneo se sintetiza para proporcionar oligómeros candidatos para la selección *in vitro* de aptámeros. Esta población de oligómero de ADN es un conjunto de secuencias aleatorias de 15 a 100 nucleótidos de longitud flanqueadas por secuencias fijas 5' y 3' de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Las regiones fijadas proporcionan sitios para la hibridación de cebadores de PCR y, en una implementación, para el inicio de la transcripción mediante una ARN polimerasa para producir una población de oligómeros de ARN. Las regiones fijadas también contienen sitios de restricción para clonar aptámeros seleccionados. Muchos ejemplos de regiones fijadas se pueden usar en evolución del aptámero. Véase, por ejemplo, Conrad et al., "In Vitro Selection of Nucleic Acid Aptamers That Bind Proteins," *Methods in Enzymology*, 267:336 - 83 (1996); Ciesiolka et al., "Affinity Selection-Amplification from Randomized Ribooligonucleotide Pools," *Methods in Enzymology*, 267:315 - 35 (1996); Fitzwater, supra

Los aptámeros se seleccionan en un procedimiento de 5 a 100 ciclos. En cada ciclo, los oligómeros se unen a la molécula diana, se purifican aislando la diana a la que están unidos, se liberan de la diana y después se replican mediante de 20 a 30 generaciones de amplificación por PCR.

La selección de aptámeros es similar a la selección evolutiva de una función en biología. Someter la población de oligonucleótidos heterogéneos al procedimiento de selección de aptámeros descrita anteriormente es análogo a someter una población biológica en reproducción continua a de 10 a 20 acontecimientos de selección intensa para la función, con cada selección separada por de 20 a 30 generaciones de replicación.

- 5 La heterogeneidad se introduce, por ejemplo, solo al principio del procedimiento de selección de aptámeros, y no se produce a lo largo del procedimiento de replicación. Como alternativa, la heterogeneidad se puede introducir en estadios más tardíos del procedimiento de selección de aptámeros.

Se pueden usar diversos oligómeros para la selección de aptámeros, incluyendo, por ejemplo, oligómeros de 2'-fluoro-ribonucleótido, aptámeros de ribosa sustituidos con NH<sub>2</sub> t sustituidos con OCH<sub>3</sub> y aptámeros de desoxirribosa. Las poblaciones de ARN y ADN son igualmente capaces de proporcionar aptámeros configurados para unirse a cualquier tipo de molécula diana. Dentro de cada población, los aptámeros seleccionados se producen a una frecuencia de 10<sup>9</sup> to 10<sup>13</sup>, véase Gold et al., "Diversity of Oligonucleotide Functions," Annual Review of Biochemistry, 64:763 - 97 (1995), y con mayor frecuencia tienen afinidades de unión nanomolares por la diana, afinidades tan fuertes con las de los anticuerpos a antígenos afines. Véase, Griffiths et al., EMBO J., 13:3245 - 60 (1994).

15 Con el uso de oligómeros 2—fluoro-ribonucleótido es probable que aumenten las afinidades de unión de diez a cien veces las obtenidas con ribooligonucleótidos o desoxiribooligonucleótidos insustituidos. Véase Pagratis et al., "Potent 2'-amino and 2' fluoro 2'deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor" Nature Biotechnology, 15:68 - 73. Dichas bases modificadas proporcionan interacciones de unión adicionales e incrementan la estabilidad de las estructuras secundarias de los aptámeros. Estas modificaciones también hacen que los aptámeros sean resistentes a las nucleasas, una ventaja significativa para aplicaciones del sistema en tiempo real. Véase Lin et al., "Modified RNA sequence pools for in vitro selection" Nucleic Acids Research, 22:5229 - 34 (1994); Pagratis, supra.

#### Bioingeniería de las balizas de aptámero

Una vez seleccionados los aptámeros, se modifican adicionalmente mediante bioingeniería para formar balizas de aptámero. Los aptámeros se alteran modificando la secuencia primaria del aptámero, de modo que además de la conformación de unión, el aptámero puede ahora formar conformaciones alternativas no de unión secundarias y/o terciarias. Normalmente, los aptámeros se pliegan en estructuras secundarias y terciarias activas que facilitan la unión y normalmente permanecen en esta conformación de unión. Cambiando o añadiendo a las secuencias de nucleótidos de los aptámeros para formar balizas de aptámero se establece una conformación alternativa que no es de unión que se ve favorecida energéticamente en ausencia de una molécula diana. En presencia de una molécula diana, la conformación de unión de la baliza de aptámero se ve favorecida sobre la conformación de no unión. En otras palabras, estos nucleótidos adicionales se usan para permitir que la baliza de aptámero tenga una conformación de unión estable y favorecida cuando entra en contacto o se une a una molécula diana y que tenga una o más conformaciones no de unión que no forman la conformación de unión en ausencia de la diana. De nuevo, la baliza de aptámero puede existir en dos o más estados; la unión a la diana actúa como desplazamiento molecular entre estos dos estados. Además, la o las conformaciones no de unión no deben ser tan estables como para evitar la unión de la baliza de aptámero a la diana. No obstante, una vez que la baliza de aptámero se une a una diana, la conformación de la unión es, preferentemente, la más favorecida.

Los grupos o restos indicadores, incluyendo pigmentos, enzimas u otros reactivos, o pares de reactivos, que son sensibles al cambio conformacional, también se incorporan en los aptámeros modificados mediante ingeniería para formar las balizas de aptámero. Los restos indicadores se pueden incorporar en las balizas de aptámero antes de la transcripción o después de la transcripción y potencialmente se pueden introducir en aptámeros conocidos o en un conjunto de oligonucleótidos del que se seleccionan los aptámeros deseados.

Tras la unión de la baliza de aptámero a una molécula diana, los restos indicadores están activados y generan señales concomitantes (por ejemplo, en el caso de un pigmento fluorescente, una alteración en la intensidad de la fluorescencia, anisotropía, longitud e onda o FRET).

Los aptámeros seleccionados usando procedimientos tradicionales, por ejemplo SELEX, normalmente tienen una secuencia de ácido nucleico mínima conocida y a menudo tienen un sitio de unión conocido. Estos aptámeros se modifican mediante ingeniería añadiendo secuencias de oligonucleótidos que normalmente contienen, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, o 7 nucleótidos, que son complementarios a una región dúplex del aptámero e, idealmente, son complementarios a la región del aptámero que se une a la molécula diana, es decir la región de unión al aptámero. Las regiones del aptámero preferidas a las que los oligonucleótidos complementarios deberían hibridar se pueden determinar usando programas de software de predicción de la estructura secundaria tales como M-FOLD™.

Estos programas de software también se pueden usar para comparar diferentes balizas de aptámero hipotéticas diferentes. En un aspecto, la energía libre predicha para la forma sin unir alternativa de la baliza de aptámero debería ser inferior a (es decir, más estable) la energía libre predicha para la conformación de unión. Este nivel de energía total se puede ajustar en base a una serie de factores, incluyendo la composición base y el número de pares de bases. En condiciones de temperatura estándar, el oligonucleótido complementario no debería tener más de 7

nucleótidos, porque probablemente un tallo formado de 8 pares de nucleótidos permanecerán en dicha conformación, y no podrá cambiarse a la conformación de unión a la diana.

Una vez preparados los candidatos a baliza de aptámero adecuados, usando técnicas de síntesis de ácido nucleico estándar, se pueden analizar en un ensayo de determinación estructural para ver si la molécula diana deseada modula el cambio predicho de la conformación. Un ensayo de determinación estructural de este tipo es una electroforesis en gel sensible a la conformación monocatenaria que se puede realizar en un gel de acrilamida al 8% (proporción de bis:acrilamida 75:1), incluyendo 0,5X TBE (Tris-borato 0,045M, EDTA 0,002 M, pH 8,5) y 10% de glicerol. Un pequeño volumen de los candidatos a baliza de aptámero radiomarcados (1  $\mu$ M) se incuban con o sin la molécula diana (10  $\mu$ M) en el tampón de unión (normalmente, el mismo tampón usado para la selección de aptámeros). Las muestras se mezclan con un volumen igual de 50% de glicerol y azul bromofenol (0,05 %) y después se cargan en un gel. La electroforesis se lleva a cabo con 300V en un cuarto frío. Después de la carrera, el gel se seca y se expone a película Kodak X-OMAT durante la noche. Los resultados se leen del gel para determinar si la conformación del candidato a baliza de aptámero es modulada por la molécula diana. Idealmente, como se puede determinar a partir de este aptámero, los candidatos a baliza de aptámero deberán existir en dos o más conformaciones en ausencia de la molécula diana y en solo una conformación unida a la diana, en presencia de la molécula diana.

Después de modificar los aptámeros mediante bioingeniería y analizarlos opcionalmente para determinar sus cambios conformacionales, se añaden uno o más grupos o restos indicadores, tales como pares de una molécula fluorescente e inactivador como se describe en el presente documento, usando pigmentos estándar de ácidos nucleicos, reactivos y procedimientos de síntesis estándar. Los procedimientos de detección descritos más adelante se pueden usar para determinar la utilidad del aptámero.

En el presente documento se describen balizas de aptámero que sufren un cambio muy grande en la conformación tras la unión a la diana. No obstante, los nuevos procedimientos funcionan igual de bien con balizas de aptámero que sufren cambios pequeños aunque detectables, tales como cambios normalmente hallados en las ribozimas.

#### 25 Unión de las balizas de aptámero a un sustrato sólido

Los soportes sólidos para sujetar las balizas de aptámero pueden ser, por ejemplo, una lámina plana de cristal, tal como un portaobjetos de cristal. Otras superficies sólidas también son adecuadas, como de metal, plástico y cerámica. Una técnica para unir las balizas de aptámero a un portaobjetos de cristal se ilustra en las Figuras 1A y 1B.

30 Con referencia a las Figuras 1A y 1B, una baliza de aptámero se puede fijar a un portaobjetos de cristal uniendo un grupo amina de un resto inactivador 6 de la baliza de aptámero al cristal a través de una molécula ligadora 8. La finalidad y la unión del resto inactivador 6 se describe más adelante con referencia a las Figs. 3A-3D. En el ejemplo descrito en las Figuras 1A y 1B, la molécula ligadora 8 es  $C_6O_4Si$ , y el inactivador 6 es  $C_6H_4NH_2$ . Se pueden usar otras moléculas ligadoras e inactivadores conocidos.

35 En primer lugar, el ligador 8 se une al portaobjetos de cristal sumergiendo el portaobjetos en una solución, incluyendo el ligador 8 y agua ácida (pH 3,0) a 90°C durante cuatro horas (Fig. 1A). Después de las cuatro horas, el ligador 8 recubrirá la superficie del portaobjetos. Después, las balizas de aptámero se unen a las moléculas ligadoras sobre el portaobjetos a través del grupo amina del inactivador 6. Para unir a través de los grupos amina, la superficie recubierta del cristal se expone a una solución que incluye el par baliza de aptámero/inactivador y  $CH_3CN$  a 20°C durante 1,5 horas. Las balizas de aptámero se pueden localizar en un punto concreto sobre el portaobjetos de cristal aplicando una microgota de la solución baliza de aptámero- $CH_3CN$  a un punto preciso sobre el portaobjetos usando un micropipeteador robótico. Véase, por ejemplo, Schena et al., "Parallel Human Genome Analysis: Microarray-Based Expression Monitoring of 1000 Genes," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93: 10514 - 19 (1996).

45 Con referencia a la Fig. 2, una baliza de aptámero que tiene un ligador extendido se puede unir al portaobjetos de cristal directamente en lugar de mediante un inactivador. Se pueden usar varias moléculas ligadoras conocidas. El ligador extendido puede permitir que la baliza de aptámero se extienda más hacia el líquido encima del portaobjetos, lo que facilita la unión a las moléculas diana. El procedimiento para unir la baliza de aptámero mostrada en la Figura 2 es similar al procedimiento para unir la baliza de aptámero/inactivador de la Fig. 1B. (El fluoróforo 22 y el inactivador 24 mostrados en la Figura 2 se describirán más adelante con referencia a las Figs 3A-3D y 4A-4D.)

55 Otros procedimientos para unir a los oligonucleótidos al cristal se describen en Shalon et al., "A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-Color Fluorescent Probe Hybridization," Genome Res., 6:639 - 45 (1996) (oligonucleótidos UV reticulados con una superficie recubierta por poli-L-lisina), y Morgan y Taylor, "A Surface Plasmon Resonance Immunosensor Based on the Streptavidin-Biotin Complex." Biosens. Bioelectron., 7:405 - 10 (1992) (aptámeros unidos usando estreptavidina).

Diferentes balizas de aptámero configuradas para unirse a diferentes moléculas diana se pueden unir a diferentes puntos sobre el portaobjetos. Por ejemplo, diferentes balizas de aptámero se pueden colocar en diferentes puntos en una matriz bidimensional. Cada punto en la matriz puede contener, por ejemplo, un punto de balizas de aptámero

idéntico, aplicado en el portaobjetos como una gota, como se ha descrito anteriormente con referencia a las Figuras 1A y 1B. Cada punto contiene, por ejemplo, aproximadamente  $10^7$  balizas de aptámero. Dado que los puntos pueden separarse por tan poco como 300 micrómetros usando un micropipeteador robótico, un portaobjetos de cristal típico con un área de superficie de, por ejemplo,  $1,8 \text{ cm}^2$ , puede contener, por ejemplo, aproximadamente 6.000 puntos de diferentes balizas de aptámero. Véase, por ejemplo, Lashkari et al., "Yeast Microarrays for Genome Wide Parallel Genetic and Gene Expression Analysis," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 94:13057 - 62 (1997).

Los puntos relacionados de balizas de aptámero se pueden agrupar en grupos sobre un portaobjetos. Por ejemplo, en ensayos de fármacos, los puntos de balizas de aptámero configurados para unirse a los diferentes metabolitos de un fármaco concreto, por ejemplo cocaína, se pueden agrupar en una región o grupo de la matriz, y puntos configurados para detectar los metabolitos de otro fármaco, por ejemplo LSD, se pueden agrupar en una segunda región. Además, diferentes puntos de balizas de aptámero dirigidos a detectar diferentes sitios de unión en una diana, por ejemplo diferentes epítomos sobre un antígeno, se pueden agrupar en un grupo. La organización de puntos relacionados en grupos en la matriz puede simplificar el análisis de los resultados.

Las balizas de aptámero también se pueden unir a portaobjetos usando procedimientos de enmascaramiento de fotorresistencia conocidos en la industria de la electrónica. Dichas técnicas, que ya se han adaptado a circuitos de oligonucleótidos de ADN para la detección de ácido nucleico, permitiría la producción en masa de matrices de balizas de aptámero que tienen, por ejemplo, aproximadamente  $10^7$  copias de una baliza de aptámero e cada punto en una matriz, y, por ejemplo, próximamente  $6,5 \times 10^4$  puntos en, por ejemplo, una matriz de  $1,64 \text{ cm}^2$ . Véase, por ejemplo, Pease et al., "Light Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequence Analysis," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 91:5022 - 26 (1994).

#### Detección de la unión de las moléculas diana a las balizas de aptámero

Se pueden emplear diversos esquemas para detectar la unión de las balizas de aptámero a moléculas diana. En primer lugar, los restos indicadores de las balizas de aptámero pueden ser indicadores fluorescentes que se monitorizan, por ejemplo, para detectar cambios en la eficiencia de la fluorescencia. En segundo lugar, se pueden observar cambios en la emisión de Raman de las balizas de aptámero causados por la presencia de una molécula diana. En tercer lugar, los desplazamientos en las resonancias de plasmón superficial en la superficie de la matriz se pueden detectar monitorizando el cambio de la longitud de onda o el ángulo incidente de la luz absorbida o usando un interferómetro de Mach-Zehnder. En cuarto lugar, los grupos o restos indicadores pueden ser enzimas o sustancias químicas que se pueden monitorizar para detectar cambios en las propiedades físicas que se producen cuando la baliza de aptámero cambia la conformación tras la unión a una molécula diana.

#### A. Detección mediante fluorescencia

Para detectar la unión mediante monitorización de la emisión de fluorescencia se pueden incorporar fluoróforos en restos indicadores de las balizas de aptámeros. Estos restos indicadores están configurados de un modo tal que su eficiencia de fluorescencia cambia cuando una molécula diana se une a la baliza de aptámero y cambia la conformación de la baliza de aptámero, de modo que señala la presencia de moléculas diana en la muestra. La eficiencia de la fluorescencia se puede medir usando, por ejemplo, excitación de la onda evanescente y una cámara CCD o un detector de recuento de fotones únicos.

#### 1. Restos indicadores de fluoróforo

Los restos indicadores de fluoróforo pueden ser, por ejemplo, un par de transferencia de la energía de fluorescencia que señala un cambio de conformación en una baliza de aptámero o marcadores fluorescentes convencionales cuya eficiencia depende de la conformación de la baliza de aptámero.

Los restos indicadores de baliza de aptámero pueden ser, por ejemplo, un fluoróforo e indicador, como se muestra en las Figs. 3A-3D, o un sistema de transferencia de energía o de carga, como se muestra en las Figs. 4A-4D. Con referencia a las Figuras 3A-3D, las balizas de aptámero 10a y 10b incluyen porciones de bucle 12a y 12b, porciones de tallo 14a y 14b, y regiones de unión (líneas negras gruesas) 16a y 16b configuradas para unirse a las moléculas diana 18a y 18b, respectivamente. En la baliza de aptámero 10a, la región de unión 16a está completamente dentro de una porción de bucle 12a, mientras que en la baliza de aptámero 10b, la región de unión 16b solapa con la porción de bucle 12b y la porción de tallo 14b.

Un resto o grupo indicador 20 puede incluir un fluoróforo 22 (representado como un pentágono) y un inactivador 24 (representado como un cuadrado), ambos unidos a los tallos 14a y 14b. Cuando el inactivador 24 está cerca del fluoróforo 22, como se muestra en las Figs. 3A y 3C, el fluoróforo 22 se inactiva y no brilla significativamente tras la excitación. Cuando el fluoróforo 22 y el inactivador 24 están separados, como se muestra en la Fig. 3B, el fluoróforo 22 (ahora representado como un asterisco) brilla significativamente con más eficacia.

La unión de moléculas diana 18a y 18b a las regiones de unión 16a y 16b rompe la unión de los pares de bases en los tallos 14a y 14b, de modo que se separan los fluoróforos 22 de los inactivadores 24. Excitando un fluoróforo 22 y determinando su eficiencia de fluorescencia, un observador puede deducir la presencia o ausencia de una molécula diana unida.

El fluoróforo 22 puede ser, por ejemplo, ácido 5-(2'-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfónico ("EDANS"), fluoresceína o antranilamida. El inactivador 24 puede ser, por ejemplo, un grupo químico tal como ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo) benzoico ("DABCYL"), rodamina o eosina.

- 5 El fluoróforo 22 y el inactivador 24 se pueden incorporar en balizas de aptámero 10a y 10b usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Tyagi and Kramer. "Molecular Beacons: Probes That Fluoresce Upon Hybridization," Nature Biotech., 14:303 - 08 (1996).

10 Los grupos indicadores también pueden incluir un sistema de transferencia de energía. Con referencia a las Figuras 4A-4B, una baliza de aptámero 40a tiene un oligonucleótido 42a con una región de unión 44a configurada para unirse a una molécula diana 46a. El grupo indicador 48 incluye un resto aceptor/emisor de fluorescencia 50 (representado como un pentágono) y un resto donante/absorbente de energía 52 (representado como un cuadrado), unidos al oligonucleótido 42a. Cuando el resto emisor 50 y el resto absorbente 52 están cerca, como se muestra en la Fig. 4B, se transfiere energía entre los restos, y el resto emisor 50 (ahora representado como una estrella) brilla con eficiencia. No obstante, cuando el resto emisor 50 y el resto absorbente 52 están separados, como se muestra en las Figs. 4A, no se produce transferencia de energía entre los restos y el resto emisor no brilla.

15 La unión de la molécula diana 46a a la región de unión 44a cambia la conformación de la baliza de aptámero 40a moviendo las uniones de los pares de bases. Cuando la molécula diana 46a no se une a la región de unión 44a, el segmento 54 del oligonucleótido 42a hibrida con el segmento 56. No obstante, cuando la molécula diana 46a está unida al segmento 54 hibrida con el segmento 58. El cambio en la conformación de la baliza de aptámero 40a tras la unión de la molécula diana 46a acerca el resto de emisión 50 y el resto absorbente 52, lo que permite una transferencia de energía entre los restos y, por tanto, una emisión eficiente por el resto 50. Por tanto, monitorizando la eficiencia de la fluorescencia del indicador 48, un observador puede deducir la presencia o ausencia de una molécula diana 46a.

25 Las figuras 4C-4D ilustran la operación del mismo sistema de transferencia de energía en una baliza de aptámero diferente. La baliza de aptámero 40b tiene un oligonucleótido 42b con una región de unión 44b configurada para unirse a una molécula diana 46b. El resto de emisión de fluorescencia 50 y el resto absorbente de energía 52 están unidos a los oligonucleótidos 42b. Antes de la unión de la molécula diana 46b a la región de unión 44b, el segmento 60 hibrida con el segmento 62 y el segmento 64 hibrida con el segmento 66. No obstante, cuando la molécula diana 46b se une a la baliza de aptámero 40b cambia la conformación y el segmento 62 hibrida con el segmento 64 y los segmentos 60 y 66 permanecen sin hibridar.

30 El resto de emisión de fluorescencia 50 puede ser, por ejemplo, Cy5. El resto absorbente 52 puede ser, por ejemplo, fluoresceína o tetrametilrodamina ("TMR").

El resto emisor 50 y el resto absorbente 52 puede unirse a los oligonucleótidos 42a y 42b usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Sixou et al., "Intracellular Oligonucleotide Hybridization Detected by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)," Nucleic Acids Res., 22:662 - 68 (1994).

35 En lugar de diseñar balizas de aptámero con indicadores de transferencia de energía, se pueden usar otros indicadores de fluorescencia conocidos en la materia. Por ejemplo, una baliza de aptámero se puede marcar con un fluoróforo cuya eficiencia de fluorescencia depende del ambiente químico de la molécula a la que está unido. La unión de la molécula diana a la baliza de aptámero cambia la conformación de la baliza de aptámero, de modo que cambia el ambiente químico del fluoróforo de modo que produce un cambio detectable en la fluorescencia del fluoróforo.

## 2. Sistemas de detección de fluorescencia basados en superficie

Un sistema de detección para monitorizar la eficiencia de la fluorescencia de los indicadores puede usar excitación de onda evanescente para excitar los fluoróforos y una cámara CCD enfriada o un detector de recuento de un fotón para medir la fluorescencia.

45 La figura 5 ilustra el principio general de la excitación de la onda evanescente. En la figura 5, un límite 110 separa un primer medio 112 que tiene un índice de refracción  $n_1$  desde un segundo medio 114 que tiene un índice de refracción  $n_2$ , en el que  $n_2$  es superior a  $n_1$ . Un rayo de luz 116 viaja a través del segundo medio 114 y se acerca a un límite 110 en un ángulo incidente de grados. Cuando es superior o igual al ángulo crítico para una reflexión interna total, cuando el ángulo crítico es igual al arcoseno ( $n_2/n_1$ ), el rayo de luz se refleja totalmente en el límite 110. A pesar del hecho de que la luz se refleja internamente totalmente en el límite 110, parte de energía de una onda en propagación 118 entra en el primer medio 112. La onda 118 que se propaga al medio 112 se denomina onda evanescente y penetra en el primer medio 112 por una distancia dependiente de la longitud de onda conocida como la profundidad de la piel. La profundidad de la piel  $s$  una función de la longitud de onda de la luz, el ángulo de incidencia del haz en la superficie y los índices de refracción de ambos materiales. Normalmente, la profundidad de la piel es del orden de varios cientos de nanómetros para la luz visible y disminuye exponencialmente con respecto al límite 110. La onda evanescente 118 se puede usar para excitar las moléculas en o cerca del límite 110 sin alterar las moléculas más allá de la profundidad de la piel.

Con referencia a la Fig. 6, un sistema de detección de fluorescencia 130 que usa excitación de la onda evanescente incluye un láser 132, un prisma de reflexión interno 134 con un cubreobjetos 135, una lente 136 y un detector 138.

5 Con referencia a la Fig. 7, el cubreobjetos de cristal 135 está fijado a un prisma de cristal 134 usando, por ejemplo, un líquido del mismo índice, tal como un aceite, de modo que nada de aire los separa. El prisma 134, el cubreobjetos 135 y el aceite tienen todos ellos índices de refracción similares, de modo que no existe un límite óptico entre el prisma 134 y el cubreobjetos 135.

10 El cubreobjetos 135 tiene una superficie superior 150 que forma un límite entre un primer medio (cristal) y un segundo medio (aire). Fijado a la superficie 150 hay balizas de aptámero 10a, 10b, 10c. Cada baliza de aptámero 10a, 10b, 10c tiene un indicador de tipo inactivador 20. Una molécula diana 18 se ha unido a la baliza de aptámero 10c, pero no a balizas de aptámeros 10a y 10b.

15 Para excitar los fluoróforos 22a, 22b, and 22c en los indicadores 20, un rayo de luz 152 pasa al prisma 114 y se refleja totalmente internamente en la superficie 150. Una onda evanescente (no mostrada) viaja desde la superficie 150 a las balizas de aptámero 10a, 10b, 10c, y excita los fluoróforos 22a, 22b, y 22c. Dado que los fluoróforos 22a y 22b están inactivados, no brillarán con eficiencia. No obstante, el fluoróforo 22c no se inactiva y mostrará mayor fluorescencia que antes de la unión de la molécula diana 18. A partir de estos resultados, un observador puede deducir que una molécula diana 18 se ha unido a la baliza de aptámero 10c pero no a las balizas de aptámero 10a y 10b.

20 El rayo de luz 152 se genera por láser 112. El láser 112 puede ser, por ejemplo, un láser de iones –argón que emite en nueve líneas espectrales discretas 458 nm and 530 nm, un láser de helio y neón que emite a 633 nm o un láser de diodo que emite a 635 nm. Como alternativa, el rayo 152 puede ser otra forma de radiación electromagnética generada por una fuente que no es el láser 112. Por ejemplo, el rayo 152 puede ser infrarrojos, ultravioleta o microondas.

25 Como se muestra en la Fig. 6, el detector 138 está acoplado ópticamente al cubreobjetos 135 por la lente. La lente 136 tiene el mismo objetivo que en un microscopio óptico. Como alternativa, el detector 138 se puede acoplar al cubreobjetos 135 mediante un acoplador fiberoptico 160, como se muestra en la Fig. 8. La entrada del termopar 160 está cerca de la superficie 150.

30 El detector 138 es, por ejemplo, una cámara CCD o un detector de recuento de fotones únicos que tiene, por ejemplo, un microscopio confocal. Para maximizar la capacidad del detector 138 para discernir los niveles bajos de fluorescencia, la luz e fondo y la luz difusa deberán minimizarse. La luz difusa se puede reducir, por ejemplo, añadiendo filtros de espectros al detector 138 que filtran la luz ambiente, y mediante barrido (escaneando la matriz una línea cada vez para aumentar la discriminación espacial).

### 3. Sistemas de detección de fluorescencia basados en solución

35 Un sistema de detección para monitorizar la eficiencia de la fluorescencia de los grupos indicadores de las balizas de aptámero en solución puede incluir una fuente de luz, tal como un láser; óptica enfocable, tal como una lente; filtros o monocromadores para efectuar cambios en el espectro de excitación o emisión de fluorescencia; un cambio para mantener la solución; y una cámara CCD enfriada o un detector de recuento de un fotón único para medir la fluorescencia,

40 La Fig. 12 ilustra un sistema de detección 300 para usar en procedimientos de detección en fase de solución. Un láser 310, tal como un láser de ion argón, se puede usar como fuente de luz. En este ejemplo, la luz láser se puede filtrar con un filtro de pase de banda 320 de 488 nM para excitar los grupos indicadores marcados con fluoresceína con un filtro de pase de banda de 5140 nM para excitar los grupos indicadores marcados con rodamina, lo que permite la detección de múltiples dianas. Después, la luz impacta sobre el vaso de la muestra 330 para excitar la fluorescencia en la muestra. El vaso de muestras podría ser una cubeta en la cual se introduce la solución o capilarmente a través de lo cual la solución fluye. Después, la salida de la fluorescencia se recoge con una lente u otra óptica de recolección de luz 340. La salida de la fluorescencia se filtra después para eliminar la luz de excitación y opcionalmente para proporcionar la discriminación de la diana, usando filtros 350. En este ejemplo, se podría usar un filtro de paso de banda e 515-520 nM para detectar los grupos indicadores marcados con fluoresceína y un filtro con paso de banda de 56.-580 nM para detectar las dianas marcadas con rodamina. En esta ilustración, la luz filtrada se centra con una lente 360. Por último, la fluorescencia emitida se detecta mediante una CCD enfriada o un detector de recuento de un solo fotón 370.

### B. Monitorización de la emisión de Raman

55 La unión de una molécula diana también se puede detectar mediante la observación de un cambio en la emisión de Raman de la baliza de aptámero. Véase, por ejemplo, Angel et al., la patente de EE.UU. Nº 4.781.458. El procedimiento experimental para medir la emisión de Raman es similar al procedimiento descrito anteriormente para medir la eficiencia de la fluorescencia. Las balizas de aptámero unidas a la superficie de un portaobjetos o un cubreobjetos se excitan mediante una onda evanescente y la emisión de Raman se mide usando una cámara CCD o un contador de un solo fotón. Para aislar las señales de emisión de Raman bastante débiles se pueden aplicar filtros

de corte adecuados a los detectores.

Se puede usar excitación de Raman tanto resonante como no resonante. En caso necesario las emisiones de Raman se pueden potenciar cambiando el recubrimiento de la superficie del sustrato, por ejemplo añadiendo plata, oro o platino. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.781.458, supra.

#### 5 C. Monitorización de las resonancias de plasmón superficial

La unión de las moléculas diana a las balizas de aptámero pueden producir cambios localizados en el índice de refracción del sustrato. Estos cambios localizados se pueden medir monitorizando los cambios en las resonancias de plasmón superficial en una película fina de metal depositada en la interfaz entre la solución de baliza de aptámero y el sustrato de cristal.

10 Los electrones en un metal se pueden modelar como un plasma de materia condensada. Los electrones libres en la superficie del plasma exhiben fluctuaciones características de la densidad o "oscilaciones del plasmón superficial". Los plasmones de superficie se pueden excitar hasta resonancia usando, por ejemplo, una onda evanescente. Véase, por ejemplo, Foster, la patente de EE.UU. Nº 5.485.277. Cuando un haz de radiación reflejado internamente completamente excita los plasmones de superficie a la resonancia, la frecuencia de la onda reflejada disminuye de forma brusca, El ángulo incidente preciso, que excita los plasmones superficiales gasta resonancia, se pueden  
15 detectar como una disminución brusca en un gráfico de la energía de la onda reflejada como una función del ángulo de incidencia.

20 Cuando las moléculas diana se unen a balizas de aptámero unidas a una película de metal fina, el índice local de refracción en dicho punto varía se desplaza la longitud de onda concreta y/o el ángulo de incidencia para excitar los plasmones superficiales en resonancia. La unión de una molécula diana a una baliza de aptámero (o la unión de un gran número de moléculas diana idénticas o en un gran número con respecto a balizas de aptámero idénticas en una matriz., Por tanto, se puede detectar observando un desplazamiento en la longitud de onda o el ángulo incidente requerido para excitar los plasmones superficiales en resonancia.

25 Un sistema para detectar la unión de moléculas diana a balizas de aptámero midiendo los desplazamientos en condiciones de resonancia de plasmón superficial puede incluir, por ejemplo, un prisma de cuarzo con una película de plata depositado sobre él mediante evaporación al vacío, Para la detección de resonancia de plasmón superficial, se enfoca un haz en el prisma de modo que un cono de ángulos incidentes se pueda medir de forma simultánea. El haz reflejado internamente totalmente se colima y se obtienen imágenes con, por ejemplo, una cámara CCD. La condición angular resonante aparece como una banda oscura en el perfil del haz. La unión de las moléculas diana a las balizas de aptámero produce un desplazamiento en la condición de resonante, que se traduce en un  
30 desplazamiento espacial en la banda oscura en el perfil del haz.

35 Los cambios en las condiciones de la resonancia de plasmón superficial también se pueden observar usando un interferómetro de Mach-Zehnder (MZI). En un MZI, un haz coherente se lanza por dos piernas de igual longitud de recorrido, lo que tiene como resultado una interferencia destructiva total del haz en una salida en la que los dos haces se recombinan. El cambio de la longitud eficaz de una de las piernas, por ejemplo alterando el índice de refracción en un punto de la pierna, destruye la condición de interferencia destructiva. Los MZI son sensibles a los cambios de longitud del trayecto tan pequeños como fracciones de la longitud de onda de la luz incidente. Véase, también, Kusunose et al. patente de EE.UU. Nº 5.771.097.

40 Un MZI que tienen fibras ópticas en modo sencillo que actúan esencialmente como guías de onda se puede construir para detectar la unión de las moléculas diana a balizas de aptámero. El recubrimiento con película metálica en la que se inducen oscilaciones del plasmón superficial se deposita a lo largo de las longitudes de las guías de onda de la fibra óptica y las balizas de aptámero están unidas al recubrimiento pelicular.

45 El MZI inicialmente se ajustará de modo que el haz desencadene resonancia en plasmón superficial en la pierna que tiene el recubrimiento pelicular y las dos piernas se recombinan fuera de fase, lo que tiene como resultado una interferencia destructiva total. La unión de las moléculas diana con las balizas de aptámero sobre el recubrimiento pelicular cambiará la condición de la resonancia en dicha pierna y destruirá las condiciones para una interferencia destructiva total en la salida del interferómetro. Por tanto, la detección de luz en la salida indicará que las moléculas diana se han unido a las balizas de aptámero en una pierna del MZI. La medición de la intensidad de la luz recombinada puede indicar la cantidad de moléculas diana que se han unido.

#### 50 D. Otros esquemas de detección

También se pueden emplear otros esquemas para unir las moléculas diana a las balizas de aptámero. Por ejemplo, los grupos indicadores aparte de los fluoróforos también se pueden incorporar en balizas de aptámero. Los grupos indicadores pueden señalar un cambio conformacional en la baliza de aptámero causado por la unión de la molécula diana o pueden interactuar con la molécula diana de un modo que cambia la naturaleza de la diana.  
55 Dichos indicadores pueden ser, por ejemplo, un resto cargado que transfiere la energía a una diana unida. Ejemplos de estos indicadores incluyen enzimas proteicas.

Las balizas de aptámero se pueden unir a polímeros conductores, en los que la unión de una molécula diana a la baliza aptámero y el cambio resultante en la conformación de la baliza de aptámero produce un cambio conformacional en el polímero de modo que se altera la conductividad. E cambio en la conductividad podrá determinarse, por ejemplo, midiendo una resistencia en el polímero.

- 5 En otro procedimiento, la baliza aptámero se puede diseñar para catalizar una reacción química después del cambio en la conformación inducido por la unión de una molécula diana. La presencia de una molécula diana unida podría deducirse detectando productos de la reacción,

La presencia de moléculas diana s puede detectar usando un sistema de baliza de aptámero e dos componentes. Con referencia a la Fig. 9A, los componentes 70 y 72 de baliza de aptámero tienen regiones de unión que se unen a sitios de unión separados (p. ej., diferentes ) 74 y 76 sobre una molécula diana 78. El componente 70 de la baliza de aptámero tiene un marcador fluorescente 80, mientras que el componente 72 de baliza de aptámero está unido el sustrato de cristal 82. Obsérvese que para las mediciones a base de solución no se necesita unir 72 a 82.

Para detectar la presencia de la molécula diana 78 en una muestra, la muestra se mezcla primero con una solución que incluye el componente 70 de la baliza de aptámero. Si las moléculas diana 78 están presentes, se unirán a los sitios de unión 74 sobre el componente 70 de la baliza de aptámero. Después, la mezcla muestra/solución se expone al sustrato 82. Las moléculas diana se unirán después al el componente 72 de la baliza de aptámero sobre el sustrato mediante los sitios de unión 76. La presencia de las moléculas diana 78 unidas al el componente 72 de la baliza de aptámero se puede detectar después observando la fluorescencia del marcador 80. Como alternativa, las moléculas diana 78 en solución se pueden añadir a un contenedor o verter o gotear sobre un sustrato sólido 82, tal como un portaobjetos de cristal, al que se unen los el componentes 72 de la baliza de aptámero. Cualquier molécula diana 78 no unida se elimina mediante lavado y después los componentes 70 de la baliza de aptámero marcados se añaden al contenedor o soporte sólido, donde se unen a cualquier molécula diana 78 unida al sustrato sólido 72 mediante las balizas de aptámero 72.

La Fig. 9B ilustra otro sistema de detección de baliza de aptámero de dos componentes. En la Fig. 9B, el componente 66 de la baliza de aptámero, unido al sustrato 82, tiene un resto de absorción de energía 88 unido al segmento 96 y un componente de baliza de aptámero 90 tiene un resto de emisión de fluorescencia 92 unido al segmento 98. La unión de ambos componentes de baliza de aptámero 86 y 90 a una molécula diana 94 acerca el segmento 96 al segmento 98, lo que permite una transferencia de energía entre los restos, lo que produce que el resto de emisión de fluorescencia 92 emite fluorescencia, como se ha tratado anteriormente con referencia a las Figs. 4A-4D. La energía se transferirá desde el resto absorbente 88 al resto de emisión 92 siempre que la distancia S entre los restos sea inferior a 100 Å.

Para mejorar la eficiencia de la transferencia de energía entre el resto de absorción 88 y el resto de emisión 92, los segmentos 98 y 96 pueden estar configurados para hibridar entre sí cuando los componentes 90 y 86 de la baliza de aptámero están unidos a la molécula diana 94. Por ejemplo, para permitir la hibridación, las colas de poli-A y poli-T se pueden añadir a os segmentos 98 y 96, respectivamente. Como alternativa, a os segmentos 98 y 96 se pueden añadir secuencias complementarias más complicadas con objeto de reducir la probabilidad de otros polinucleótidos, por ejemplo colas de polinucleótido con otras balizas de aptámero hibridarán no asépticamente con los segmentos 98 y 96.

Además, se puede usar espectroscopia de masas, por separado o junto con los sistemas de detección anteriores, para identificar o cuantificar más unidos a moléculas diana.

También se describen otros sistemas de detección.

#### **Uso e interpretación de matrices de aspecto de la baliza.**

Los sistemas de ensayo descritos anteriormente se pueden usar en diversos campos diferentes, incluyendo, por ejemplo, análisis del rendimiento de potenciación de fármacos ilegales en seres humanos o animales; análisis para determinar venenos, contaminantes, aditivos o componentes modificados por ingeniería genética de alimentos; análisis forenses; comprobaciones del estado de salud; identificación de enfermedades específicas y monitorización de la progresión de una enfermedad, por ejemplo cáncer; detección de contaminantes y rastreo de contaminantes; análisis del equilibrio ambiental (ríos, lagos, humedales, suelos y aire sanos), detección de riesgos biológicos; detección de venenos químicos o sustancias químicas; detección de explosivos o fármacos ilegales, por ejemplo e aeropuertos; detección de polen y otros alérgenos en el ambiente; detección de la presencia de tipos concretos de animales o peces en ambientes específicos, por ejemplo tiburones en un área de baño, truchas en un lago o corriente; e identificación de dianas para descubrir fármacos.

Además de analizar simultáneamente una muestra para detectar la presencia de una pluralidad de dianas diferentes, la matriz también se puede analizar para detectar la presencia de una única diana mediante la unión a la diana de una pluralidad de formas diferentes. Dicha prueba tendría una sensibilidad mayor que los ensayos convencionales con moléculas diana.

Por ejemplo, se puede construir una matriz de baliza de aptámero que tenga diferentes puntos de balizas de

aptámero configurados o seleccionados par la unión a diferentes sitios de unión de una única diana. Los diferentes puntos de balizas de aptámero pueden, por ejemplo, estar configurados para unirse a diferentes epítomos de un único antígeno, al diferentes sitios de unión en la misma proteína o a diferentes proteínas de superficie de una única bacteria. Los diferentes puntos que contienen balizas de aptámero diseñados o seleccionados para unirse a diferentes sitios de unión sobre la misma diana se pueden agrupar juntos en un grupo. Si el sistema de detección muestra que las dianas se han unido a todos o casi todos los puntos de balizas de aptámero en dicho grupo, un observador puede concluir con gran confianza que la diana está presente en la muestra.

De un modo similar, las matrices de balizas de aptámero o grupos de puntos de balizas de aptámero se pueden construir para analizar diversos enantiómeros de una molécula o diferentes isómeros de una fórmula molecular.

Las figuras 10A y 10B ilustran el uso e interpretación de un simple ensayo basado en balizas de aptámero para detectar venenos dañinos en alimentos. Con referencia a la Fig. 10A, una matriz de balizas de aptámero 178 unidas a un cubreobjetos 180 incluye nueve puntos de balizas de aptámero dispuestos en tres filas de tres puntos cada una. Los puntos 182a, 182b, and 182c de la fila uno contienen balizas de aptámero seleccionadas para unirse a tres epítomos diferentes de *Clostridium botulinum*. Los puntos 184a, 184b, 184c de la fila dos contienen balizas de aptámero que se unen a tres epítomos diferentes de una bacteria de *Salmonella*. Los puntos 186a, 186b, 186c de la fila tres contienen balizas de aptámero seleccionadas de modo que se unen a tres conservantes diferentes que se encuentran de forma natural en un alimento concreto. No obstante, los conservantes pueden ser dañinos si están presentes en cantidades demasiado altas. Cada punto contiene, por ejemplo, aproximadamente  $10^7$  balizas de aptámero idénticas. Cada baliza de aptámero incluye un par fluoróforo-inactivador, como se ha descrito anteriormente con referencia a las Figs. 3A-3D.

En operación, el alimento que se va a analizar se disuelve en un disolvente, por ejemplo agua, y se pone en contacto con el cubreobjetos 180. El cubreobjetos 180 se coloca después encima de un prisma de reflexión interna total y los fluoróforos en las balizas de aptámero se excitan usando excitación de onda evanescente, como se ha descrito anteriormente con referencia a las 5 - 7. En la Fig. 10B se muestra una imagen de CCD 188 de la matriz tras la excitación.

Los resultados del ensayo se pueden interpretar mediante inspección visual. La ausencia de fluorescencia mediante los puntos 182a, 182b y 182c sugiere que *Clostridium botulinum* no está presente en la muestra. Sin embargo, la fluorescencia mediante los puntos 184a, 184b, and 184c sugiere que *Salmonella* está presente.

Los puntos 186a, 186b, and 186c, que están dirigidos a conservantes que normalmente se encuentran en los alimentos, brillan todos, como se esperaba. No obstante, la cantidad de fluorescencia en cada grupo se puede analizar para determinar la concentración de cada conservante presente en la muestra. Si la muestra tiene una concentración más alta de un conservante, más moléculas de conservante se unirán a las balizas de aptámero en el correspondiente punto, lo que tiene como resultado una fluorescencia total mayor del punto. Por ejemplo, en la Fig. 10B, el punto 186a brilla más que los puntos 186b y 186c, lo que indica una concentración más alta del conservante concreto.

Para determinar visualmente si la concentración de un conservante es peligrosamente alta, el brillo de un punto concreto, por ejemplo la fluorescencia asociada con el punto 186a se puede comparar con un molde que muestra niveles de fluorescencia para concentraciones normales. Además, para obtener datos más cuantitativos, las "curvas" de concentración o estudios control para cada conservante (o cada molécula diana para dicha materia) se pueden establecer usando el sistema de las balizas de aptámero y las muestras de un conservante dado (u otra diana) a varias concentraciones conocidas que varían de altas a bajas.

### **Software de reconocimiento de patrones y análisis**

En el uso de la matriz de balizas de aptámero descrita anteriormente con referencia a las Figs. 10A y 10B, los resultados del ensayo se pueden determinar simplemente mediante inspección visual. No obstante, como se ha indicado anteriormente, ensayos basados en balizas de aptámero más complicados pueden tener desde decenas a miles de puntos de balizas de aptámero en matrices bidimensionales. Se pueden fabricar otras matrices, por ejemplo 3-D. Los resultados de dicho ensayo podrían no ser fácilmente evidentes mediante inspección visual.

Para ayudar a analizar los resultados de los ensayos más complicados, se puede usar un nuevo software de reconocimiento y análisis de patrones, como se describe más adelante.

En resumen, el software analiza primero los resultados del sistema de detección para determinar las identidades y las cantidades de compuestos presentes en la muestra. Después, el software compara la lista de compuestos presentes en la muestra con las listas de compuestos que está previsto que estén presentes en condiciones normales y detecta cualquier desviación. Después, el software intenta interpretar y descifrar o explicar la desviación comparando la desviación con una biblioteca de resultados de ensayo conocidos.

Por ejemplo, en el análisis de la sangre de una chica de 21 años de edad para detectar fármacos ilegales usando, por ejemplo, un sistema de detección basado en fluorescencia, el software analiza primero el patrón de fluorescencia formado en un portaobjetos después de que el portaobjetos se exponga a la muestra de sangre. Detectando que

puntos de balizas de aptámero brillan y cuánto brillan, el software determina qué compuestos están presentes en la muestra y en qué cantidades. Después, el software compara la lista de compuestos con una lista de compuestos que se espera que estén presentes en la sangre de una mujer de 21 años de edad no usando fármacos y determina cualquier desviación. La desviación hallada se compara con las desviaciones conocidas que son la causa de la presencia de drogas ilegales, por ejemplo cocaína. Después, el software analiza los resultados para determinar su significación y muestra una lista de drogas ilegales presentes.

Las figuras 11A y 11B ilustran el patrón del procedimiento de detección. La Fig. 11A ilustra las etapas y la ejecución de la primera tarea del software, determinando la identidad y la cantidad de los compuestos presentes y creando una lista; o un Perfil del Compuesto Señal, y la Fig. 11B ilustra las etapas y la ejecución de la segunda tarea del software, comprando el perfil de las señales del compuesto con perfiles conocidos.

Con referencia a la Fig. 11A, el software primero recibe los datos desde el sistema de detección, normalmente una imagen, y convierte la imagen en un instrumento Raw digital 210. Para convertir la imagen en una señal digital, el software divide la imagen en sectores, correspondiendo cada sector, por ejemplo, a una baliza de aptámero en la matriz y convierte la intensidad de la señal en el sector en una representación digital. Las representaciones digitales de los sectores se almacenan, por ejemplo como matriz.

Después, un fondo 212 se resta de la señal 210 del Raw Instrument para eliminar porciones de los resultados que no son de interés (es decir, ruido de fondo). Por ejemplo, al analizar agua de río para detectar contaminantes dispersados por un factor cercano, por ejemplo el Fondo 212 puede ser la salida de resultados cuando la corriente arriba del agua de l río desde la fábrica se expone a la matriz de balizas de aptámero. Los datos que son el resultado de la resta del fondo 212 es la señal actual 214.

La señal actual 214 se compara después con una biblioteca de señal 216 de señales digitales. La Biblioteca de señal 216 incluye las señales que son el resultado de exponer la misma matriz a compuestos conocidos específicos. El software compra la señal actual 214 con diferentes combinaciones de señales en la Biblioteca de señal 216 para encontrar la combinación de señales de compuestos conocidos que más se acercan a la señal actual 214. El software determina la coincidencia más cercana del ajuste con el residual más pequeño, usando, por ejemplo, el método de los mínimos cuadrados o técnicas de desconvolución lineales o no lineales conocidos hasta una probabilidad máxima y métodos de entropía máxima. El resultado de la comparación en dos grupos distintos: Perfil del Compuesto señal 218 y señal residual 220.

El Perfil del Compuesto señal 218 es una lista de los compuestos de la biblioteca presentes en la muestra, las cantidades de cada compuesto presente y las estimaciones de incertidumbre asociadas. Perfil del Compuesto señal 218 se puede almacenar, por ejemplo como matriz. La Señal residual 220 es e componente de la Señal actual 214 no representada por la combinación elegida de señales de la Biblioteca de señales 216.

La Señal residual 220, como la Señal del instrumento Brito 210 y la Señal actual 214 pueden ser, por ejemplo, una matriz. La Señal residual 220 se analiza para determinar la significación comparando cada elemento en la matriz con respecto al nivel de incertidumbre por los correspondientes elementos en la Señal actual 214. Los elementos hallados que son significativos están marcados como Señales de Compuestos Desconocidos 222, se muestran en, por ejemplo, un monitos, y se almacenan.

Con referencia a la Fig. 11B, el siguiente software comprende además el Perfil de Compuestos de señal 218 con uno o más perfiles estándar r la Biblioteca Real de Perfiles 224. Cada perfil estándar en la Biblioteca del perfil estándar 224 es una lista de los tipos y cantidades de compuestos que se ha hallado si no hay presentes condiciones inusuales (es decir, el resultado del ensayo es negativo). Por ejemplo, para analizar una muestra de sangre de una mujer de 21 años para análisis de fármacos, el perfil estándar relevante sería l alista de compuestos prevista para el análisis de la sangre de una hembra mayor de 21 años de edad sin usar fármacos. En el análisis de contaminantes en agua de río, un perfil estándar relevante sería que los compuestos que normalmente se hallan en el agua tomada de un punto concreto en el río y en la sección y la temperatura ocasional.

En muchos casos, el Perfil del compuesto señal 218 se comparará con más de un perfil estándar en el Perfil de la biblioteca estándar 224. Los perfiles estándar también pueden incluir información de incertidumbre, por ejemplo desviaciones estándar, que podrá esperarse se una muestra estadística de los perfiles estándar relevantes en condiciones normales.

En algunos casos, los perfiles estándar pertinentes en Perfil de Biblioteca 224 serán elegidos de antemano por un usuario. En otros casos, los perfiles estándar más aplicables serán elegidos por el software mediante la determinación de la combinación de perfiles estándar es la más cercana a la señal Perfil de Compuesto 218.

Después de elegir los perfiles estándar apropiados de Perfil de Biblioteca 224, el software resta estos perfiles a partir del Perfil de Compuesto Señal 218 para crear una Desviación del Perfil estándar 226. Como Perfil de Compuesto Señal 218, la Desviación 226 es una lista de compuestos y cantidades, almacenado, por ejemplo, como una matriz.

Después, la Desviación 226 se compara con las Desviaciones de Biblioteca 227 conocidas. Cada desviación conocida en Desviaciones de Biblioteca 227 es la desviación con respecto a los perfiles estándar esperados para un

5 resultado de ensayo particular. En las pruebas de drogas, por ejemplo, una desviación conocida puede ser una lista de metabolitos adicionales que se encuentran en la sangre cuando hay cocaína presente en una muestra de sangre. Para los esteroides que mejoran el rendimiento, la desviación conocida puede incluir la diferencia entre los niveles normales y elevados de testosterona. En las pruebas de contaminación del agua, una desviación conocida puede ser la desviación prevista si una fábrica cercana está tirando tricloroetileno en una corriente.

El software compara Desviación 226 con diferentes combinaciones de desviaciones conocidas en la Desviación de Biblioteca 227 para encontrar la combinación que más se acerque a la Desviación 226. Al igual que antes, la coincidencia más cercana, o el ajuste con residual más listo, se pueden encontrar usando, por ejemplo, el método de ajuste de los mínimos cuadrados.

10 La comparación de la Desviación 226 con la Desviación de Biblioteca 227 conocida produce dos salidas: Mapa de combinación de la condición de la señal 228 y la Desviación residual 230. El Mapa de combinación de la condición de la señal 228 incluye la lista de desviaciones conocidas encontrada comparando la Desviación 226 con la Desviación de Biblioteca 227. Por ejemplo, en las pruebas de drogas, el Mapa de combinación 228 puede ser una lista de compuestos de drogas ilegales o metabolitos de compuestos de drogas ilegales presentes y las cantidades en que están presentes. Los resultados indicados en el Mapa de combinación 228 se analizan para determinar la significación estadística, considerando los datos de la incertidumbre en la Desviación 226 y los límites del intervalo en las desviaciones conocidas que se ha encontrado que están presentes. Los resultados del Mapa de combinación 15 228 que se han encontrado que son significativos se muestran y / o almacenan como el Mapa de la condición del resultado final 232 en las pruebas de drogas, por ejemplo el Mapa de la condición 232 podría enumerar metabolitos de drogas ilegales presentes en la muestra, o podría identificar las drogas ilegales que es probable que haya ingerido el individuo. En las pruebas de la contaminación del agua, el Mapa de la condición podría enumerar los contaminantes que se liberan por una fábrica cercana.

20 La Desviación residual 230 es la identidad de compuestos y las cantidades que no se explican por una combinación de desviaciones conocidas en la Biblioteca de Desviación 227. La Desviación residual 230 se sometió a detección selectiva para determinar su significación y después se mostró y/o almacenó como Señal de condición desconocida. La Señal de condición desconocida 234 es la lista de compuestos y las cantidades que se encuentran, que no se explican mediante ningún resultado de ensayo conocido.

25 Se puede entrenar al software para identificar nuevos compuestos en la Señal residual 220 y los nuevos patrones de la Desviación residual 230. Mediante el análisis de covarianza de los componentes de la señal a través de múltiples muestras recogidas en diferentes momentos o lugares, el software puede aprender a crear nuevos perfiles estándar y las nuevas desviaciones conocidas. Se puede entrenar al software, por ejemplo con el análisis diferencial usando, por ejemplo, la muestra con el módulo mínimo de vector como fondo de referencia.

30 Los métodos y las técnicas descritos en el presente documento se pueden implementar en circuitos electrónicos digitales, o en hardware, firmware, software informático, o en combinaciones de los mismos. El aparato que incorpora estas técnicas puede incluir dispositivos adecuados de entrada y salida, un procesador informático y un producto de programa de ordenador incorporado de manera tangible en un dispositivo de almacenamiento legible por ordenador para su ejecución por un procesador programable. Un proceso que incorpora estas técnicas puede ser realizado por un procesador programable que ejecuta un programa de instrucciones para realizar las funciones deseadas operando sobre datos de entrada y generando los datos de salida adecuados. Las técnicas se pueden 35 implementar en uno o más programas de ordenador que son ejecutables en un sistema programable que incluye al menos un procesador programable acoplado para recibir datos e instrucciones desde, y para transmitir datos e instrucciones a, un sistema de almacenamiento de datos, al menos un dispositivo de entrada , y al menos un dispositivo de salida.

40 Cada programa de ordenador se puede implementar en un lenguaje de programación de procedimiento de alto nivel y orientado a objeto o en lenguaje ensamblador o de la máquina si se desea; y en cualquier caso, el lenguaje puede ser un lenguaje compilado o interpretado. Procesadores adecuados incluyen, a modo de ejemplo, tanto microprocesadores de propósito general como especiales. Generalmente, un procesador recibirá instrucciones y datos desde una memoria de sólo lectura y / o una memoria de acceso aleatorio. Los dispositivos de almacenamiento adecuados que incorporan tangiblemente instrucciones y datos de programa de ordenador incluyen 45 todas las formas de memoria no volátil, incluyendo, por ejemplo, dispositivos de memoria de semiconductor, tales como EPROM. EEPROM y dispositivos de memoria flash; discos magnéticos, como discos duros internos y discos extraíbles; discos magneto-ópticos; y discos CD-ROM. Cualquiera de los anteriores se podrán complementar con, o incorporar en, ASIC (circuitos integrados de aplicación específica) especialmente diseñados.

50 El programa de ordenador y el procedimiento descrito anteriormente se pueden adaptar para analizar los resultados de los ensayos biológicos que no sean el sistema de detección basado en la baliza de aptámero descrita en el presente documento. El procedimiento y el software se pueden aplicar a cualquier ensayo biológico diseñado para detectar la presencia de compuestos conocidos en una muestra.

## Ejemplos

La invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

### **Ejemplo 1: Pruebas de detección de drogas**

En este ejemplo, una muestra de sangre extraída de un atleta de 26 años de edad se analiza para determinar la presencia de drogas para mejorar el rendimiento.

5 En primer lugar, se prepara un portaobjetos en micromatriz dirigido a detectar la presencia de varias docenas de drogas para mejorar el rendimiento conocidas, incluyendo androstenodiona, anfetaminas, esteroides basados en testosterona y otras drogas. Los metabolitos de las drogas se identifican a partir de la literatura y la experimentación.

10 El procedimiento de selección de aptámeros se realiza en un tampón de solución salina fisiológica para seleccionar aptámeros que se unen a las drogas directamente y a los metabolitos de las drogas. Los aptámeros seleccionados son aptámeros de ARN de entre 25 y 150 nucleótidos de longitud, que tienen secuencias de unión de entre 15 y 60 nucleótidos de longitud. Se usan técnicas de selección de aptámeros estándar para determinar la secuencia mínima de unión. Después, los aptámeros seleccionados se modifican por ingeniería para contener una estructura de bucle del tallo como se muestra en la figura 3. DABCYL y EDANS se añaden a los aptámeros de extremos 5 'y 3' para crear una baliza de aptámero con un sistema indicador de fluoróforos y, a continuación, las balizas de aptámero se unen a un portaobjetos de cristal en una matriz de dos dimensiones, de la manera descrita anteriormente con referencia a la figura 2.

20 Después, la muestra de sangre del atleta se disuelve en el mismo tampón de solución salina utilizado para llevar a cabo la selección de aptámeros y se coloca una gota de la solución de muestra de tampón-sangre en el portaobjetos. La muestra gota solución cubre por completo la matriz de la baliza de aptámero en el portaobjetos.

La exposición a la muestra permite que cualquier droga o metabolitos en la muestra se unan a las balizas de aptámero en la matriz. La unión de los metabolitos causa un cambio conformacional en las balizas de aptámero que tiene como resultado en la separación de los inactivadores fluoróforos de los fluoróforos, como se ha descrito anteriormente con referencia a las Figs. 3A y 3B.

25 Después de la exposición a la muestra, el portaobjetos se coloca en un prisma de reflexión interna total. Para acoplar ópticamente el portaobjetos al prisma, un aceite (tal como LASER LIQUID de Cargille Laboratories, Inc., N.J.) que tiene un índice de refracción aproximadamente igual al índice de refracción del portaobjetos de cristal y el prisma de vidrio, se coloca en el prisma debajo del portaobjetos. El aceite garantiza que no se forman burbujas de aire entre el portaobjetos y el prisma.

30 Un láser de longitud de onda apropiada se aplica después al prisma de tal manera que el haz de láser se aproxima al portaobjetos en un ángulo de incidencia aproximadamente igual al ángulo crítico para la reflexión interna total. El haz se refleja totalmente internamente en la parte superior del portaobjetos (el límite entre el cristal y el aire), creando una onda evanescente que excita fluoróforos inactivados en la matriz de la baliza de aptámero. El patrón de fluorescencia resultante de la excitación de la onda evanescente se fotografía utilizando una cámara CCD enfriada.

35 La imagen capturada por la cámara CCD se compara con una plantilla o patrones de fluorescencia de biblioteca de compuestos conocidos para determinar los metabolitos presentes. Mediante el examen de qué puntos de la baliza de aptámero en la matriz brillaba, el técnico es capaz de identificar una lista de los metabolitos presentes en la muestra de sangre. Con esta lista, el técnico puede concluir si el atleta ingirió recientemente específicos legales o drogas ilegales, tal como esteroides.

### **40 Ejemplo 2: Balizas de aptámero de trombina en solución**

SE han diseñado y analizado en solución balizas de aptámero de trombina para determinar su especificidad por la propia trombina y en comparación con el Factor IX. La adición de varios conjuntos diferentes de oligonucleótidos en el extremo 5 'de un aptámero trombina conocido G 15D formó un grupo de balizas de aptámero modificadas por ingeniería que se han diseñado para exhibir conformaciones alternativas de no unión que alteran la conformación de unión normal en una estructura de G-cuarteto del aptámero original. Las conformaciones alternativas están diseñadas para que no se unan a la trombina. La adición de trombina a una solución que contiene el aptámero cambió las concentraciones de equilibrio de las estructuras hacia la conformación de unión a trombina. Un par de fluorescencia - inactivación añadido a los extremos 5 'y 3' de algunos de los aptámeros modificados por bioingeniería permitió la determinación de la conformación de la baliza de aptámero mediante la observación de la emisión de fluorescencia. El equilibrio entre diferentes conformaciones de varios posibles candidatos de baliza de aptámero se alteró por la modificación de la composición o de la longitud de la región del tallo.

55 Las figuras 13A-D muestran una de las balizas de aptámero de trombina de nuevo diseño. La unión de la trombina (óvalo negro) a la baliza de aptámero (Fig. 13A) provoca un cambio en el equilibrio entre la estructura de tallo-bucle inactivada (fig. 13D) y la conformación inactivada (fig. 13, parte B), pasando a través de un intermedio de cadena lineal desplegado (fig. 13C), que muestra la secuencia de ácido nucleico completa de la nueva baliza de aptámero. La estrella representa un elemento fluorescente, por ejemplo, un fluoróforo, y el cuadrado blanco representa un

elemento inactivador, por ejemplo, un grupo químico. La intensidad de la emisión del fluoróforo se representa mediante el tamaño de la estrella y aumenta con la distancia entre el fluoróforo y el inactivador. Por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia es máxima en la figura. 13C y mínima en la figura. 13D, y aproximadamente igual en las Figs. 13A y 13B.

5 Las nuevas balizas de aptámero de la trombina se prepararon de la siguiente forma:

*Materiales:* Todos los oligonucleótidos, incluyendo las balizas de aptámero, se sintetizaron usando técnicas sintéticas de ADN estándar. Las balizas de aptámero (denominadas G15DxxMB) se sintetizaron mediante acoplamiento de fluoresceína en el extremo 5' y un grupo DABCYL en el extremo 3'. G15D5dF es G15D5d con 5'-fluoresceína, pero sin ningún grupo inactivador en el extremo 3'. La trombina y el factor IX se adquirieron de Enzyme Research Lab. Varios candidatos de baliza de aptámero se prepararon de la siguiente manera:

10

G15D	GGTTGGTGTGGTTGG
G15D4d	CCAAGGTTGGTGTGGTTGG
G15D5d	CCAACGGTTGGTGTGGTTGG
G15D6d	CCAACCGGTTGGTGTGGTTGG
G15D7d	CCAACCAGGTTGGTGTGGTTGG
G15D5nd	TTTTTGGTTGGTGTGGTTGG
G15D5drev	CCAACCACACCAAGTTGG

15

*Ensayo de unión competitiva:* G15D5d se radiomarcó con [<sup>32</sup>P] ATP utilizando la T4-polinucleótido quinasa. G15D5d (5nM/5000cpm) radiomarcado y los aptámeros no marcados 0-1µM en tampón de unión a trombina (TBB) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,5) se mezclaron con trombina 10 nM en 100 µl de TBB. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, las soluciones se filtraron a través de dos capas de filtro; filtro de nitrocelulosa (BA85) en la parte superior de un filtro de nylon (Hybond-P™). Los complejos trombina-aptámero se recogieron sobre filtros de nitrocelulosa, mientras que los aptámeros libres se recogieron sobre filtros de nylon. La cantidad de aptámero radiomarcado en cada filtro se determinó mediante un contador de centelleo o mediante sistema de almacenamiento de fósforo (BioRad).

20

*Electroforesis en gel sensible a la conformación de cadena sencilla:* La electroforesis en gel sensible a la conformación monocatenaria se realizó en un gel de acrilamida al 8% (proporción de bis:acrilamida 75:1), incluyendo 0,5X TBE (Tris-borato 0,045M, EDTA 0,002 M, pH 8,5) y 10% de glicerol. Un pequeño volumen de aptámeros radiomarcados (1 µM) se incubaron con o sin trombina (10 µM) en TBB. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de 50% de glicerol y azul bromofenol (0,0%) y después se cargan en un gel. La electroforesis se llevó a cabo con 300V en un cuarto frío. Después de la carrera, el gel se secó y se expone a película Kodak X-OMAT durante la noche.

25

30

*Ensayo de unión a trombina usando un espectrómetro de fluorescencia.* Los aptámeros se diluyeron a una concentración de 10 µM en TBB o TE (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) y se calentaron a 99 ° durante tres minutos y se enfrió hasta la temperatura ambiente antes del experimento. El experimento se realizó utilizando 5-40 nM de aptámero en 2 ml. Todas las mediciones de la intensidad de fluorescencia se realizaron a 24 ° C. La longitud de onda de excitación fue 495 nm y la emisión se monitorizó a su máximo, 516 nm (en TE) o 518 nm (en TBB). Se añadió un pequeño volumen (0,5-3 µl) de la trombina (concentración final de 0-250 nM) y se monitorizó el cambio de la emisión.

35

*Titulación con un oligonucleótido que contiene secuencia de complemento:* G15D5dMB a 10 µM se mezcló con diversas concentraciones de G15D5drev en TE. Las mezclas se calentaron a 99 ° durante tres minutos y después se incubaron a 50 ° C durante diez minutos antes de enfriar hasta la temperatura ambiente. La intensidad de fluorescencia se midió a una concentración del aptámero la baliza molecular r de 40 nM

40

Una evaluación preliminar de los candidatos de baliza de aptámero usando electroforesis en gel sensible a la conformación monocatenaria de G15D4d (la longitud del tallo es de 4 nucleótidos), G15D5d (la longitud del tallo es de 5), G15D6d (la longitud del tallo es de 6), G15D7d (la longitud del tallo es de 7) reveló que cada uno de estos ácidos nucleicos podrían existir en múltiples conformaciones led (Fig. 14; las líneas discontinuas indican las cales algo curvadas en el gel). G 15D4d existía en 2 conformaciones en ausencia de trombina, pero se cambió completamente a una conformación única tras la adición de la trombina. G 15D4d existía en 4 conformaciones en ausencia de trombina, pero de un modo similar a G15D4d, se cambió completamente a una conformación única tras la adición de la trombina. G15D6d y G15D7d existían en 4 conformaciones en ausencia de la trombina, pero, a diferencia de los otros dos aptámeros, sólo una fracción de los aptámeros pueden unirse con trombina. Estos

45

resultados sugirieron que G15D4d y G15D5d serían los candidatos más probables para la creación de balizas de aptámero. De estos dos estructuras, se predijo que G15D5d era el mejor candidato porque el par de bases adicional estabilizará la estructura de no unión, lo que tiene como resultado una señal más baja en ausencia de la molécula diana.

- 5 La figura 14 muestra aptámeros libres en la mitad inferior del gel y complejos de trombina: baliza de aptámero en la mitad superior del gel. En esta figura, + indica con trombina, y - indica sin trombina.

El efecto de la longitud del tallo sobre la unión de la trombina también se analizó mediante el uso de un ensayo de unión competitiva. Los cuatro aptámeros con diferentes longitudes del tallo junto con el aptámero G15D original, se analizaron para determinar la unión por un ensayo de competición con G15D5d radiomarcado (fig. 15). Como se muestra en este gráfico, G15D4d, 5d y 6d tenían curvas de desplazamiento similares, mientras que G15D7d mostró una disminución de la unión.

Las balizas de aptámero G15D4d, G15D5d, and G15D6d se marcaron mediante la adición de fluoresceína al extremo 5' y grupo DABCLY al extremo 3'. Estas balizas de aptámero, G15D4dMB, G15D5dMB y G15D6dMB, se evaluaron para determinar su respuesta a varias concentraciones de trombina (0-120 nM), en tampones TBB o TE. La Tabla 1 a continuación muestra la intensidad de fluorescencia relativa de los aptámeros. La intensidad de la fluorescencia basal de cada baliza de aptámero se midió a 40 nM de la baliza de aptámero en ausencia de trombina con la longitud de onda de excitación a 495 nm (ancho de banda de 10 nm para la excitación y la emisión) utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2500. La fluorescencia promedio de los cambios de intensidad con la adición de trombina (100 nM) se muestran en relación con la intensidad basal de cada baliza de aptámero. La Tabla 1, NC indica que no hay cambio.

<i>Aptámero</i>	<i>TBB</i>	<i>TBB + trombina</i>	<i>TE</i>	<i>TE + trombina</i>
G15D4dMB	30	1,5	98	NC
G15D5dMB	7,5	NC	19	2,3
G15D6dMB	17	NC	20	1,7
G15D5ndMB	188	0,5	1102	0,7
G15D5dF	280	NC	380	NC

La Tabla 1 muestra que G15D5dMB y G15D6dMB eran las dos mejores balizas de aptámero en TE y G15D4dMB era mejor en TBB. Mientras que G15D4dMB era capaz de unirse a trombina y aumentar la intensidad de la fluorescencia en TBB, G15D5dMB y G15D6dMB fracasaron. Sin embargo, G15D4dMB no se unió a la trombina en TE, mientras que G15D5dMB y G15D6d MB fueron capaces de interactuar con la trombina. Los cuatro dúplex de bases apareadas como en G15D4dMB pueden ser demasiado inestables en TE, mientras que cinco o seis dúplex de bases apareadas en G15D5dMB y G15D6dMB pueden ser demasiado estables en TBB para permitir el cambio conformacional que se requiere para la unión a trombina. Esto es consistente con la observación de que G15D4dMB tiene una emisión 2-3 veces mayor que G15D5dMB en TBB, lo que sugiere menos conformación dúplex. En TE, el nivel basal de G15D4dMB y G15D5dMB fue de cinco a diez veces más alto que en TBB, lo que sugiere que disminuye la población de la estructura de tallo-bucle debido a la falta del catión divalente en el tampón.

A continuación, se midió el cambio en la fluorescencia de las balizas de aptámero en el tampón de unión a trombina. Como se muestra en la figura. 16, G15D4dMB tenía una emisión moderada en ausencia de trombina. A medida que aumentaba la concentración de trombina, la intensidad de fluorescencia aumentaba, pero no alcanzó la saturación en el intervalo de concentración (250 nM) analizado. Este cambio de emisión tras la adición de trombina requirió aproximadamente 2 minutos para alcanzar su valor de equilibrio. Tanto G15D5dMB como G15D6dMB tenían una emisión de fluorescencia muy baja en ausencia de trombina, y la intensidad de la fluorescencia no cambió a medida que se aumentaba la concentración de trombina.

Debido a que las mediciones de la electroforesis en gel (Fig. 14) se realizaron en un tampón de baja salinidad (TBE), los autores midieron después el cambio en la fluorescencia de la baliza de aptámero en tampón TE. Estos resultados se muestran en la figura 17 en tampón TE. G15D4dMB tenía mucho más alto de emisión en ausencia de trombina. (Obsérvese que los valores de intensidad de fluorescencia que se muestran en la Fig. 17 son en relación con los valores indicados en la Tabla 1.). La emisión de fluorescencia de G15D4dMB no aumentó tras la adición de trombina. G15D5dMB tenía una emisión relativamente baja en ausencia de trombina que aumentó con la adición de trombina. Se estimó que la Kd era de  $3 \pm 1$  nM. El cambio en la intensidad de fluorescencia se produjo inmediatamente después de la adición de la trombina. La emisión de fluorescencia de la baliza de aptámero G15D6dMB también aumentó con la adición de trombina, pero saturado a una intensidad de emisión inferior. La Kd

estimada (12 nM) fue ligeramente superior que G15D5dMB. La  $K_d$  estimado para G15D5dMB es similar a la  $K_d$  indicada para G15D, que varió de 1,4 nM a 100 nM. Es posible que la adición de diferentes nucleótidos y sondas (el fluoróforo y el inactivador) pueda atenuar la unión a trombina. El ensayo de competición de unión al filtro mostró un incremento de aproximadamente 6 en la afinidad por G15D5dMB relación con G15D5d en TE.

- 5 Para eliminar la posibilidad de que el aptámero de unión de la baliza de aptámero-trombina simplemente cause un cambio en el entorno químico del fluoróforo, los inventores prepararon un aptámero que tenía un marcador de fluoresceína en 5', pero sin inactivador DABCYL en 3'. Este aptámero, G15D5dF, no mostró esencialmente cambio alguno en la intensidad de fluorescencia tras la adición de trombina en tampón TBB o TE (fig. 18).

- 10 El mecanismo de la baliza de aptámero debería resultar en un cambio en la emisión de fluorescencia que es similar al cambio que se detectaría si la misma baliza de aptámero se utilizara como una baliza molecular estándar. Para probar esta hipótesis, los inventores sintetizaron un oligonucleótido (G15D5rev), que es complementario a G15D5dMB. El aumento dependiente de la concentración de la intensidad de fluorescencia de la baliza de aptámero cuando se utiliza como baliza molecular se muestra en la figura. 19.

- 15 Como demostración final, se fabricó una versión modificada de G15D5dMB que ya no es capaz de formar la estructura de tallo bucle. En este aptámero, G15D5ndMB, el extremo 5' consiste en la secuencia TTTTT. Con referencia a las Figuras 13A-D. La adición de trombina a una solución que contiene este aptámero debería cambiar ahora el equilibrio entre las estructuras de AB y C, con la trombina adicional dirigiendo el estado de equilibrio hacia la estructura A. Los inventores realizaron primero esta prueba en TBB para permitir la estabilización de la conformación de unión a trombina. Como se muestra en la figura. 20, la adición de trombina disminuyó la emisión de fluorescencia del aptámero. (Obsérvese que debido a que este es un aptámero diferente, la intensidad relativa a la aptámero original no es necesariamente significativa.) La concentración semimáxima del efecto fue de aproximadamente 80 nM. Cuando los inventores realizaron este ensayo en tampón TE (datos no mostrados), la fluorescencia sin trombina fue de aproximadamente 5X que en TBB, y también disminuyó con la adición de trombina. A diferencia de la medición en TBB, no se saturó dentro del intervalo de concentración analizado.

- 25 Para confirmar la especificidad de unión de G15D5dMB, los inventores usaron el factor IX, que es una serina proteasa plasmática, como la trombina, y comparte una identidad de secuencia de 37% en el dominio catalítico con trombina. Como se muestra en la figura. 21, el Factor IX, no afectó a la fluorescencia G 15D5dMB. Aunque el Factor IX está estrechamente relacionado con la trombina, las nuevas balizas de aptámeros son muy específicas de la trombina, que muestra que las nuevas balizas de aptámero no se unen a cualquier proteína cargada positivamente.

- 30 Debido a las diferencias observadas entre la fluorescencia de la baliza de aptámero en tampón de TBB y TE, los inventores examinaron el efecto de la concentración de cationes sobre la fluorescencia de G15D5dMB en ausencia de trombina. El aptámero se prepararon como 10 uM en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y la emisión de G15D5dMB 40 nM se midió con el aumento de concentración de  $MgCl_2$  (0-2,5 mM). La titulación con  $MgCl_2$  mostró la concentración semimáxima de 50 uM (Fig. 22). Las disminuciones en la emisión por parte de los cationes es probable que se deban al efecto de estabilización sobre la estructura de tallo-bucle. Anteriormente, se informó que KCl disminuía la  $K_i$  de G15D en la inhibición de la trombina, pero no los derivados de G15D. Los inventores descubrieron que 5 mM de KCl no tenía ningún efecto significativo sobre la intensidad de fluorescencia de G15D4dMB. La alta concentración de catión monovalente (NaCl 140 mM) y 1 mM de cationes divalentes ( $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ ) también redujeron la fluorescencia.

Estos resultados demostraron que G15D5dMB era, de hecho, la baliza de aptámero preferible, como se determinó a partir de la electroforesis en gel sensible a la conformación monocatenaria de los potenciales candidatos a baliza de aptámero. Estos resultados también demostraron que el aptámero modificado por bioingeniería sí proporciona una señal a través del mecanismo de baliza de aptámero.

- 45 Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, con la anterior descripción se pretende ilustrar, y no limitar, el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una baliza de aptámero que se une a una molécula diana de ácido no nucleico específica, comprendiendo la baliza de aptámero
- 5 un oligonucleótido que comprende una porción de bucle, un primer segmento, y un segundo segmento complementario al primer segmento, en el que los primero y segundo segmentos conectados por la parte de bucle forman una porción de tallo en ausencia de cualquier ácido no nucleico específico diana;
- en el que una porción del oligonucleótido comprende una región de unión que tiene una conformación secundaria o terciaria que cambia a una conformación secundaria o terciaria diferente tras la unión a la molécula de ácido no nucleico diana específica; y
- 10 en el que un primer resto indicador está unido al primer segmento; y un segundo resto indicador está unido al segundo segmento, en el que los primero y segundo restos indicadores interactúan para producir una señal detectable cuando se cambia la distancia entre ellos;
- en el que la unión específica de la molécula diana específica a la región de unión rompe los enlaces de los pares de bases en la porción de tallo, produciendo un cambio de conformación de la baliza de aptámero que separa los primero y segundo segmentos, alterando de este modo la distancia entre los primero y segundo restos indicadores y produciendo una señal detectable.
- 15
2. La baliza de aptámero de la reivindicación 1, en la que el primer resto indicador es un fluoróforo y el segundo resto indicador es un inactivador químico, de modo que el inactivador inactiva el fluoróforo cuando los segmentos primero y segundo hibridan para formar la porción de tallo y en el que la unión de una molécula diana a la región de unión rompe las uniones de los pares de bases en la porción de tallo, lo que hace que los segmentos primero y segundo se separen y el fluoróforo se separe del grupo químico, de modo que finaliza la inactivación y se permite que el fluoróforo emita una fluorescencia detectable.
- 20
3. La baliza de aptámero de la reivindicación 1, en la que la región de unión se localiza dentro de la porción de bucle, la porción de tallo o al menos parcialmente en ambas, dentro del oligonucleótido.
- 25
4. La baliza de aptámero de la reivindicación 1, en la que el primero y el segundo restos indicadores son una enzima y un correspondiente ligando.
5. La baliza de aptámero de la reivindicación 1, en la que el primero y el segundo segmentos comprenden 4, 5, 6, o 7 nucleótidos cada uno.
6. La baliza de aptámero de la reivindicación 1, en la que la molécula diana específica es trombina.
- 30
7. Una baliza de aptámero que se une a una molécula diana de ácido no nucleico específica como se representa en las figuras 4A y 4B, comprendiendo la baliza de aptámero
- un oligonucleótido que comprende un primer segmento, un segundo segmento, y un tercer segmento, en el que los primero y segundo segmentos pueden formar enlaces de pares de bases para formar un complejo cuando la baliza de aptámero no se une a la molécula diana específica;
- 35 en el que el segundo segmento comprende una región de unión para la molécula diana de ácido no nucleico específica; y
- un primer resto indicador unido al comienzo del primer segmento;
- un segundo resto indicador unido al extremo del tercer segmento, en el que los primero y segundo restos indicadores interactúan para producir una señal detectable cuando se cambia la distancia entre ellos;
- 40 en el que tras la unión específica de la molécula diana específica de ácido no nucleico a la región de unión se rompen los enlaces de los pares de bases entre los segmentos primero y segundo y se forman enlaces de pares de bases entre los segmentos primero y tercer, de modo que se produce un cambio de conformación de la baliza de aptámero que altera la distancia entre los restos indicadores primero y segundo, produciendo de este modo una señal detectable.
- 45
8. Una baliza de aptámero que se une a una molécula diana de ácido no nucleico específica como se representa en las figuras 4C y 4D, comprendiendo la baliza de aptámero
- un oligonucleótido que comprende un primer segmento, un segundo segmento, un tercer segmento y un cuarto segmento, en el que los segmentos primero y segundo así como los segmentos tercero y cuarto pueden formar enlaces de pares de bases para formar un complejo cuando la baliza de aptámero no se une a la molécula diana específica;
- 50

- en el que el primer segmento comprende una región de unión para la molécula diana de ácido no nucleico específica;
- un primer resto indicador unido al comienzo del primer segmento adyacente al segundo segmento; y
- 5 un segundo resto indicador unido al extremo del tercer segmento adyacente al cuarto segmento, en el que los restos indicadores primero y segundo interactúan para producir una señal detectable cuando se cambia la distancia entre ellos;
- 10 en el que tras la unión específica de la molécula diana específica de ácido no nucleico a la región de unión se rompen los enlaces de los pares de bases entre los segmentos primero y segundo así como los segmentos tercero y cuarto y se forman enlaces de pares de bases entre los segmentos segundo y tercero, de modo que se produce un cambio de conformación de la baliza de aptámero que altera la distancia entre los restos indicadores primero y segundo, produciendo de este modo una señal detectable.
9. La baliza de aptámero de la reivindicación 7 u 8, en la que el primer resto indicador es un resto absorbente de energía y el segundo resto indicador puede ser un resto emisor de fluorescencia, de forma que cuando los restos indicadores primero y segundo están lo bastante cercados, el resto absorbente permite una transferencia de energía entre los restos, de modo que permite que el resto emisor emita fluorescencia; y en el que la unión de una molécula diana a la región hace que los segmentos primero y segundo hibriden.
- 15 10. La baliza de aptámero de la reivindicación 7, en la que el complejo es un dúplex.
11. Un dispositivo para detectar de forma simultánea la presencia de una pluralidad de moléculas diana de ácido no nucleico diferentes en una muestra, comprendiendo el dispositivo:
- 20 un soporte sólido; y
- una pluralidad de diferentes balizas de aptámero de la reivindicación 1 unidas al soporte, teniendo cada baliza de aptámero un primer extremo unido al soporte, y una región de unión que se une a una molécula diana de ácido no nucleico, en el que las regiones de unión de las diferentes balizas de aptámero se unen a diferentes moléculas diana.
- 25 12. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que el soporte sólido comprende una superficie de cristal a la que los primeros extremos de las balizas de aptámero están unidas covalentemente.
13. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que el soporte comprende una superficie plana y las balizas de aptámero se distribuyen sobre la superficie plana en una matriz bidimensional.
- 30 14. El dispositivo de la reivindicación 13, en el que los puntos de balizas de aptámero idénticas se localizan en diferentes puntos en la matriz bidimensional.
15. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que la región de unión de al menos una de las balizas de aptámero está configurada para unirse a una molécula diana de ácido no nucleico específica seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un esteroide y una molécula inorgánica.
- 35 16. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que las balizas de aptámero comprenden ARN, ADN, ARN modificado, ADN modificado o una combinación de los mismos.
17. El dispositivo de la reivindicación 16, en el que uno de los restos indicadores comprende un fluoróforo.
18. Un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de una o más moléculas diana específicas diferentes en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 40 la obtención de una pluralidad de balizas de aptámero de la reivindicación 1;
- poner en contacto la muestra con las balizas de aptámero, de tal manera que cualquier molécula diana específicas en la muestra pueda unirse a las correspondientes regiones de unión de las balizas de aptámero; y
- detectar la presencia de moléculas diana específicos unidas a las balizas de aptámero.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que las balizas de aptámero están en un líquido.
- 45 20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que las balizas de aptámero están unidas a un soporte sólido.
21. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el soporte sólido es una partícula.
22. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el soporte sólido es una placa.

23. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que las balizas de aptámero emiten radiación de fluorescencia cuando son excitadas por ondas evanescentes.
24. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que diferentes puntos, comprendiendo cada punto una pluralidad de balizas de aptámero idénticas se distribuyen sobre el soporte sólido en una disposición predeterminada, y el procedimiento comprende además comparar un patrón de fluorescencia de la muestra con patrones de fluorescencia conocidos.
25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que la etapa de comparación incluye el uso de un programa informático, dispuesto en un medio legible por ordenador, incluyendo el programa de ordenador instrucciones para hacer que un procesador:
- compare el patrón de fluorescencia de la muestra con una biblioteca de patrones de fluorescencia conocidos; y
- seleccione la combinación de patrones de fluorescencia conocidos que más se acerque al patrón de fluorescencia de la muestra.
26. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la etapa de detección incluye detectar un cambio en las frecuencias de emisión de Raman de una baliza de aptámeros, cambio causado por la unión de una molécula diana específica a la baliza de aptámero.
27. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el soporte sólido comprende una película de metal a la que están unidos los aptámeros y la etapa de detección incluye detectar un cambio en la condición resonante de los plasmones superficiales en la película metálica causada por la unión de una molécula diana específica a una baliza de aptámero.
28. Un dispositivo para detectar la presencia de una molécula diana específica en una muestra, comprendiendo el dispositivo:
- un soporte sólido; y
- una pluralidad de diferentes balizas de aptámero de la reivindicación 1 unidas al soporte, teniendo cada baliza de aptámero un primer extremo unido al soporte, y una región de unión que se une a un enantiómero específico de la molécula diana o un sitio de unión específico de la molécula diana, en el que las regiones de unión de las diferentes balizas de aptámero se unen a diferentes enantiómeros de la molécula diana o a diferentes sitios de unión de la molécula diana.
29. El dispositivo de la reivindicación 28, en el que la molécula diana específica comprende un antígeno, y los diferentes sitios de unión comprenden diferentes epítomos del antígeno.
30. El dispositivo de la reivindicación 28, en el que la molécula diana específica comprende una bacteria, y los diferentes sitios de unión comprenden diferentes proteínas de la superficie de las bacterias.
31. Un sistema para detectar de forma simultánea la presencia de una pluralidad de moléculas diana de ácido nucleico diferentes en una muestra, comprendiendo el sistema:
- una pluralidad de diferentes balizas de aptámero de la reivindicación 1 unidas al soporte, teniendo cada baliza de aptámero un primer extremo unido al soporte, una región de unión que se une a una molécula diana de ácido nucleico específica, las regiones de unión de diferentes aptámeros de unión a diferentes moléculas diana específicas; y
- un sistema de detección que detecta la presencia de moléculas diana específicas unidas a balizas de aptámero, comprendiendo el sistema de detección una fuente de radiación y un detector.
32. El sistema de la reivindicación 31, en el que la fuente de radiación comprende un láser.
33. El sistema de la reivindicación 31, que comprende además un analizador para determinar la presencia de moléculas diana en la muestra en base a los resultados del detector, en el que el analizador comprende un procesador informático programado para:
- comparar la salida del detector con una biblioteca de salidas conocidas correspondientes a la exposición de muestras de composición conocida a las balizas de aptámero; y
- seleccionar una combinación de resultados conocidos que más se acerque a los resultados del ensayo.
34. El sistema de la reivindicación 31, en el que las balizas de aptámero están en un líquido.
35. El sistema de la reivindicación 31, en el que las balizas de aptámero están unidas a un soporte sólido.

36. La baliza de aptámero de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido comprende ARN o ARN modificado.
37. La baliza de aptámero de la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido comprende ADN o ADN modificado.
38. Un sistema para detectar de forma simultánea la presencia de una pluralidad de moléculas diana de ácido no nucleico diferentes en una muestra, comprendiendo el sistema:

5 una pluralidad de diferentes especies de balizas de aptámero de la reivindicación 1, en el que cada especie de balizas de aptámero tiene un grupo indicador diferente, una región de unión que se une a una molécula diana de ácido no nucleico específica y en el que las regiones de unión de diferentes aptámeros se unen a diferentes moléculas diana específicas; y

10 un sistema de detección que detecta la presencia de moléculas diana específicas unidas a balizas de aptámero, siendo el sistema de detección capaz de detectar los diferentes grupos indicadores.

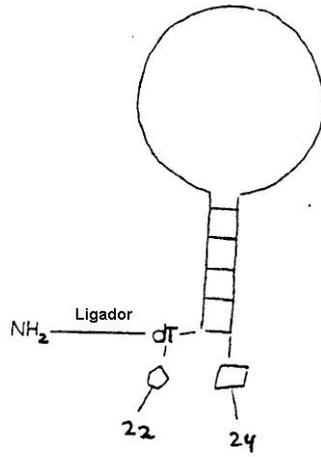
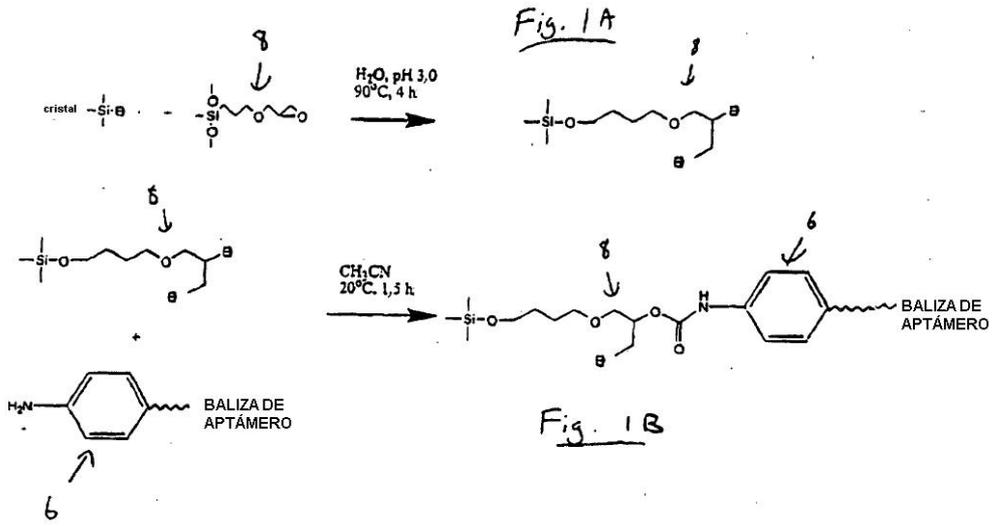


Fig. 2

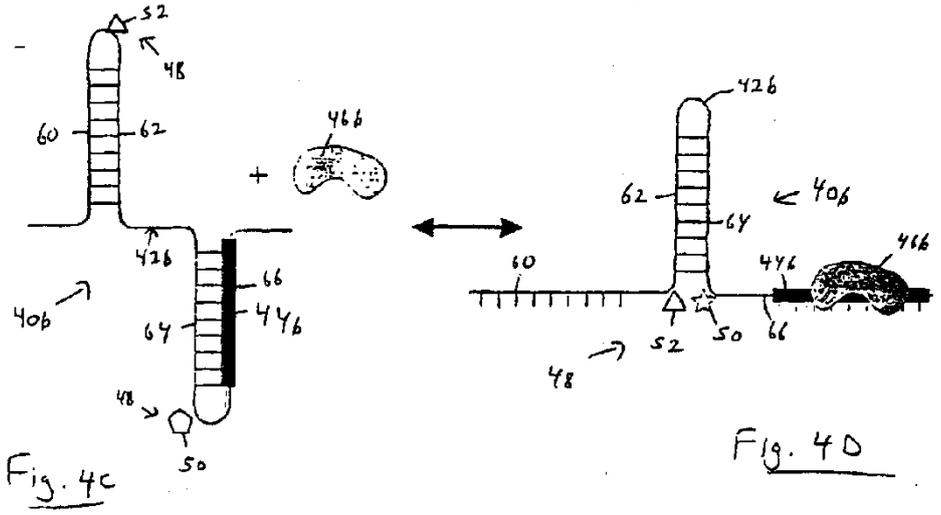
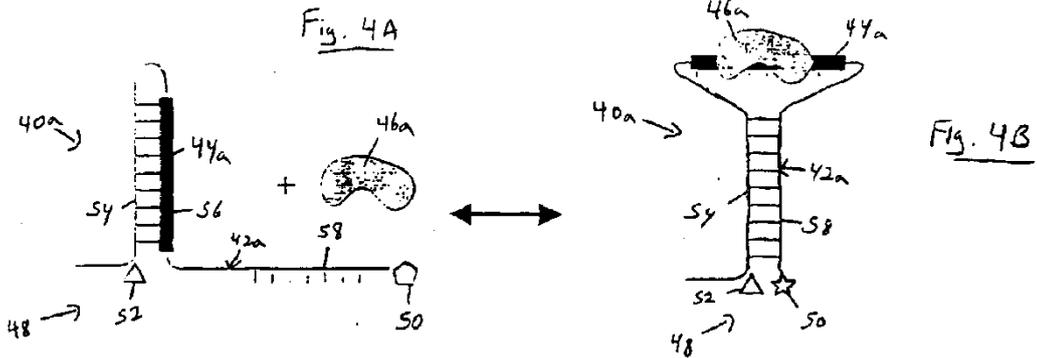
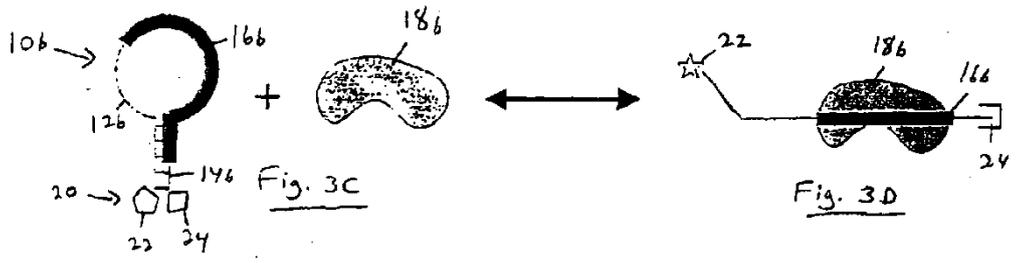
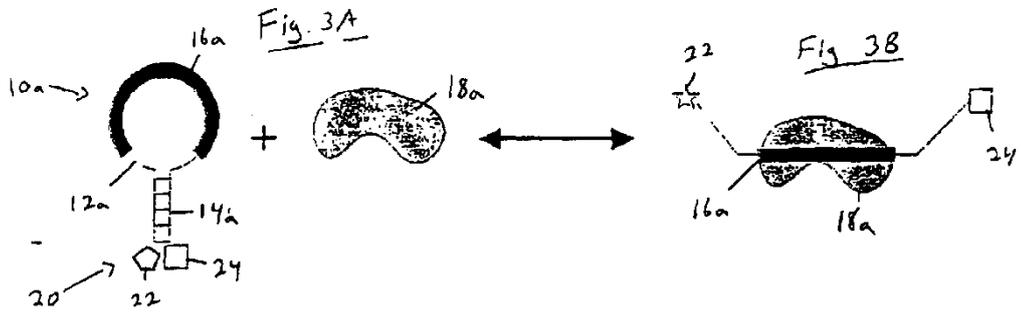


Fig. 5

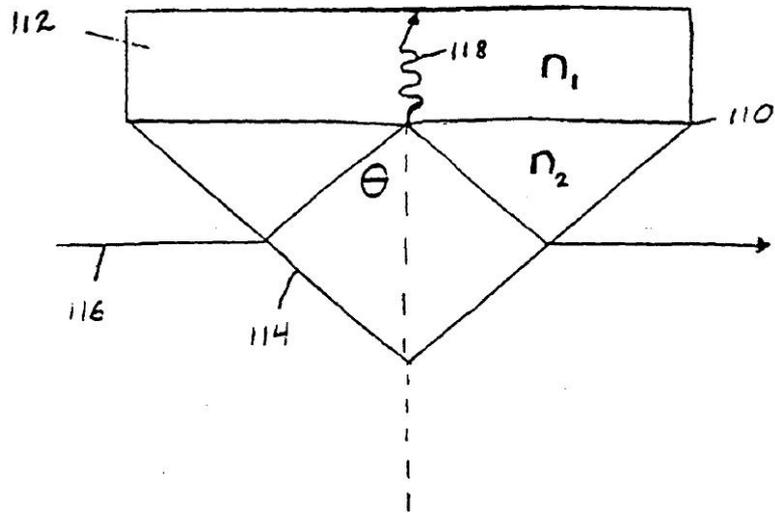


Fig. 6

130 →

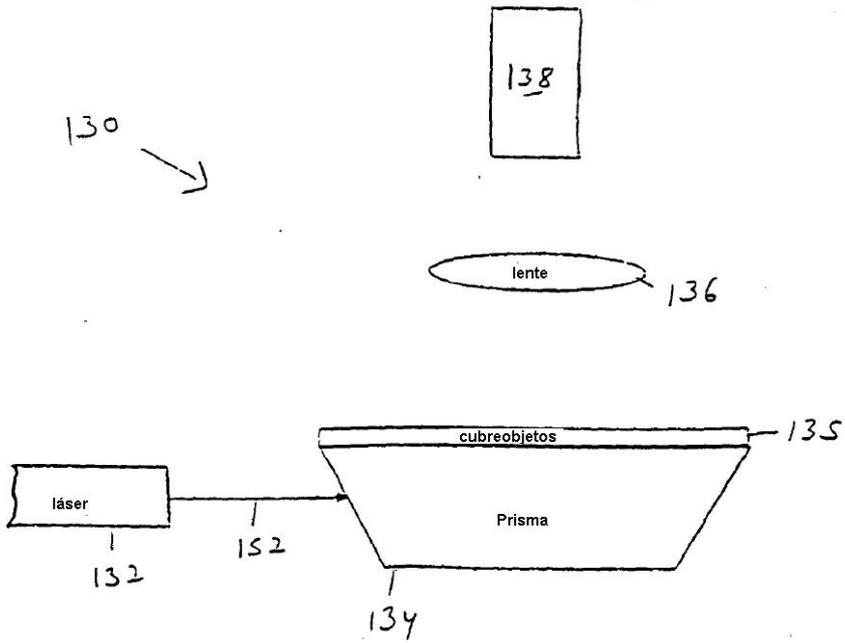


Fig. 7

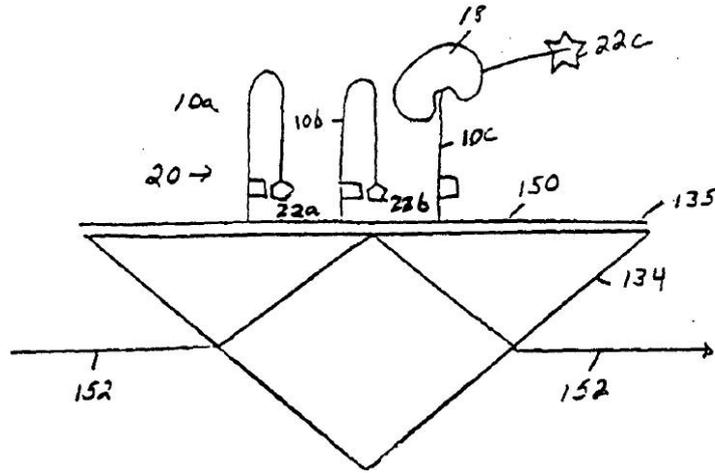


Fig. 8

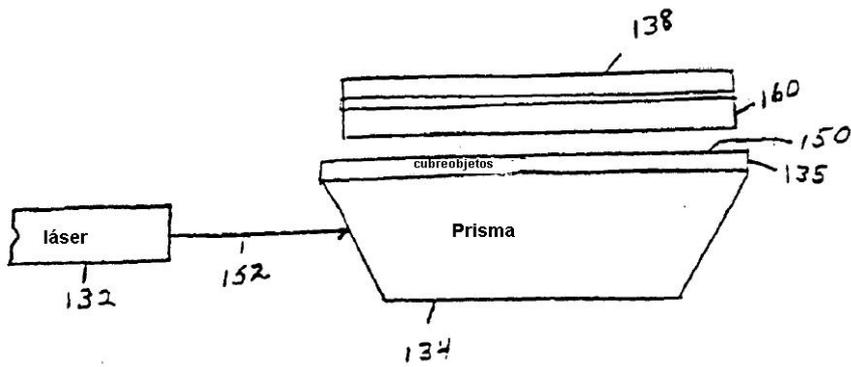


Fig. 9A

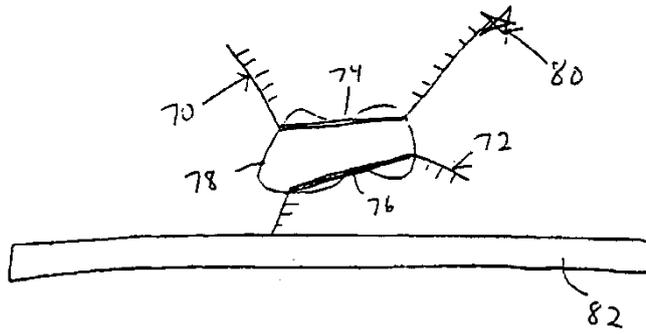


Fig. 9B

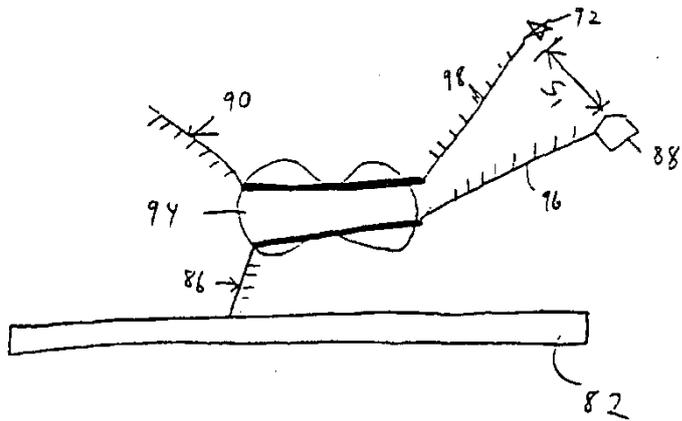


Fig. 10A

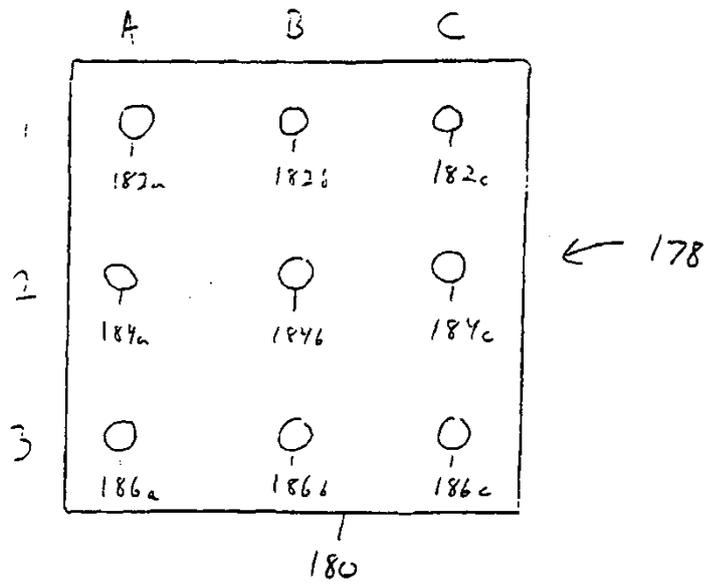


Fig 10B

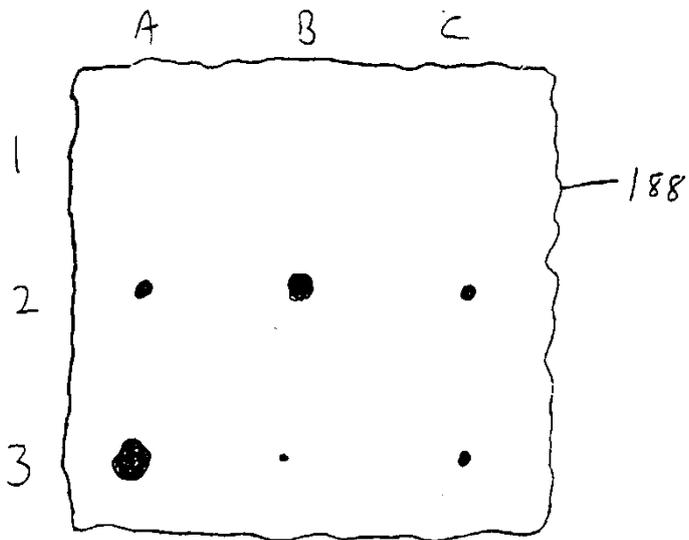


Fig. 11A

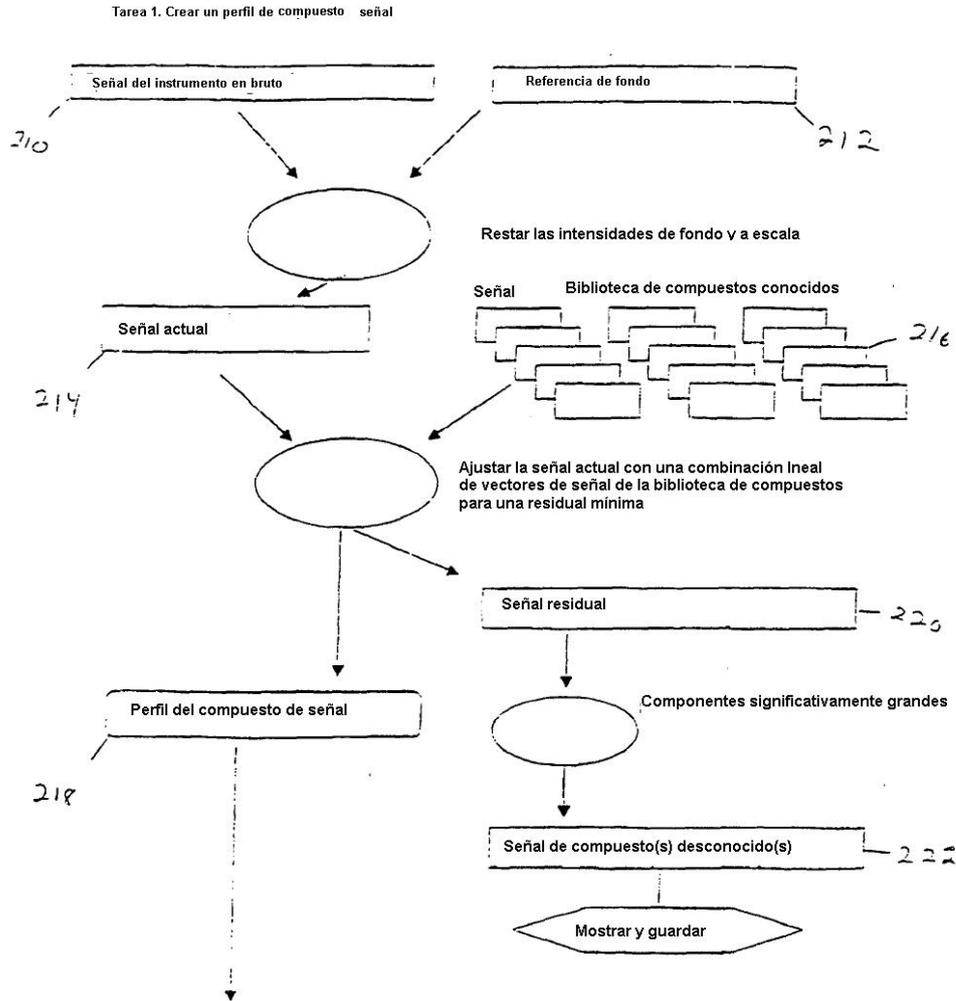
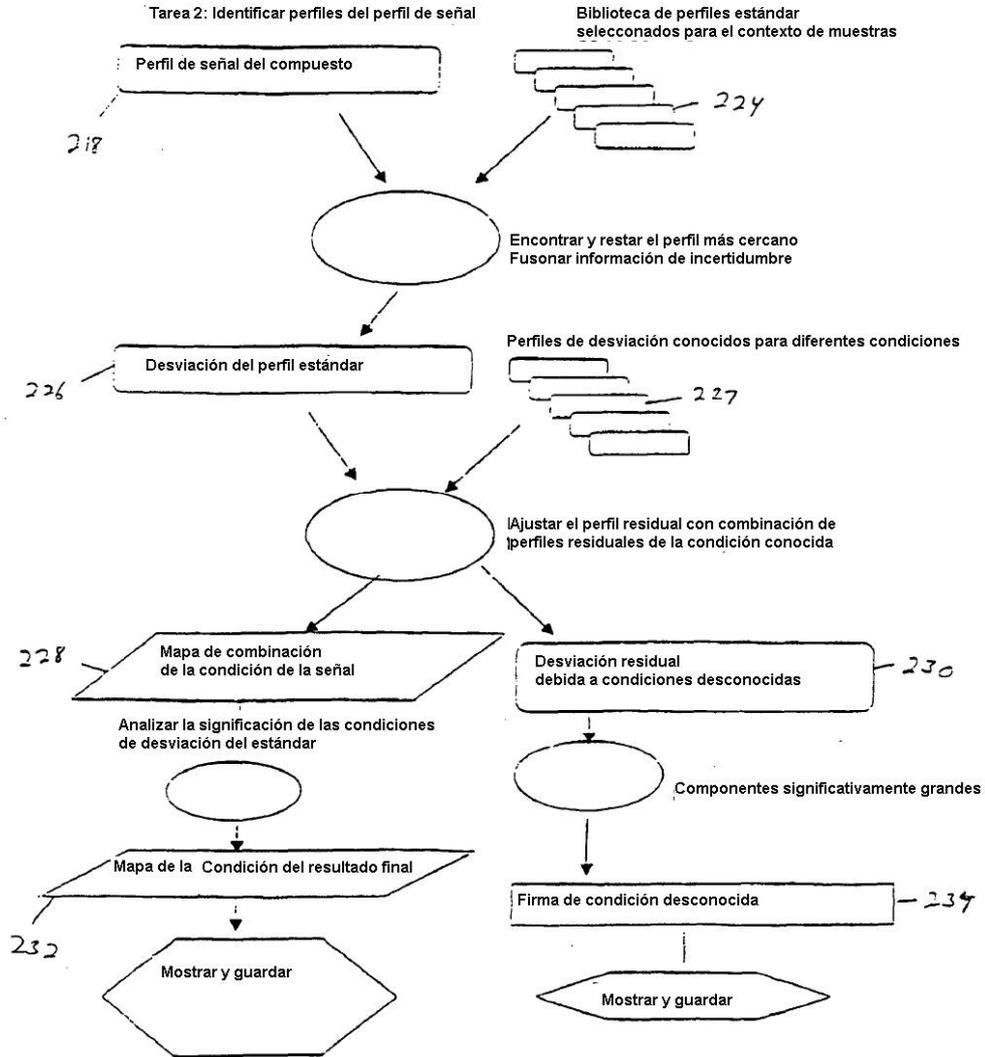


Fig. 11B



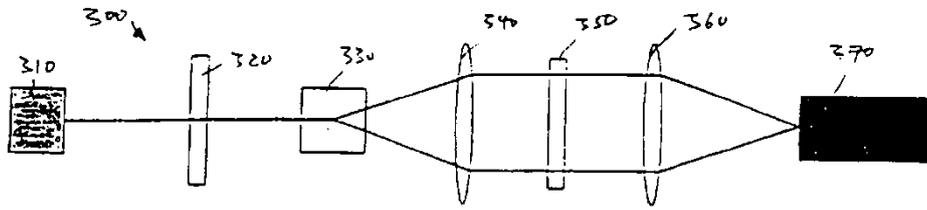


Fig. 12

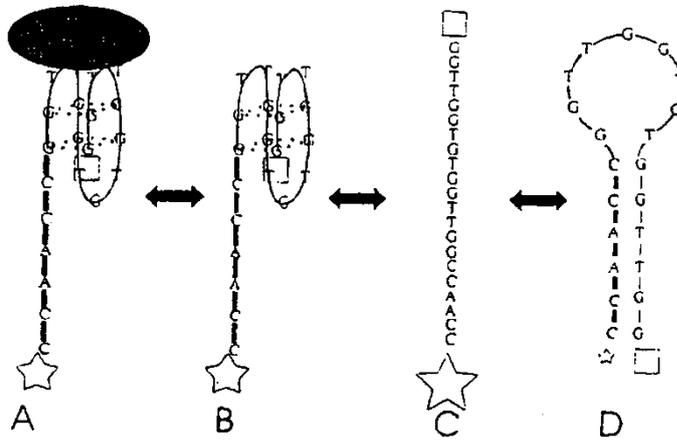


Fig. 13A

Fig. 13B

Fig. 13C

Fig. 13D

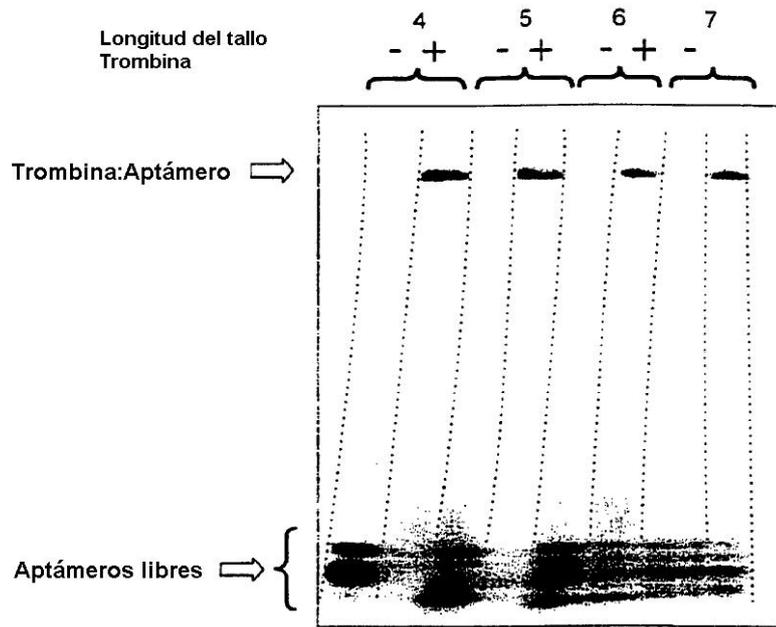


Fig. 14

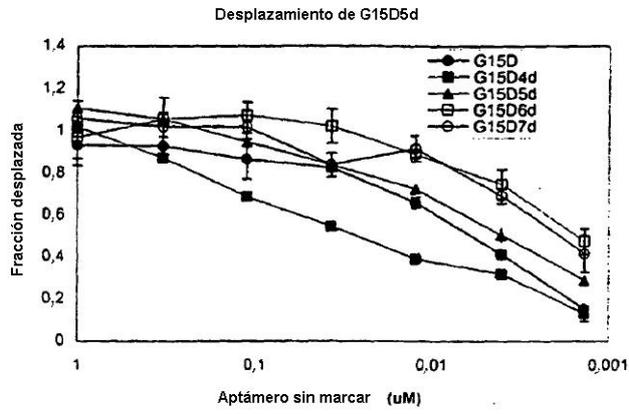


Fig. 15

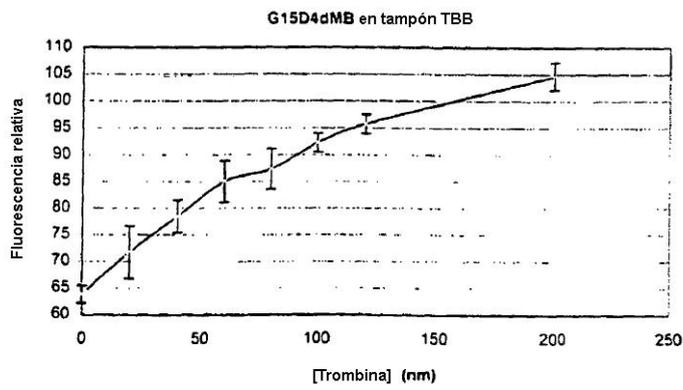


Fig. 16

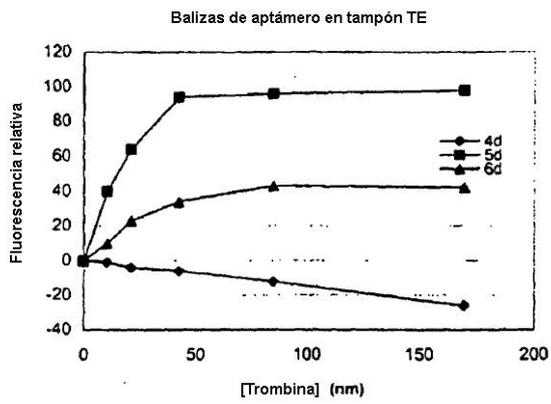


Fig. 17

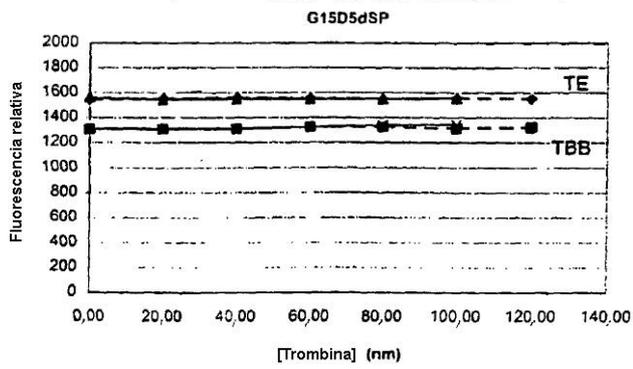


Fig. 18

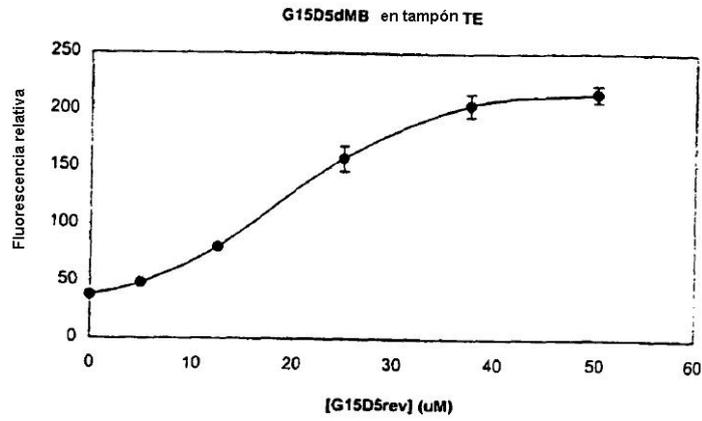


Fig. 19

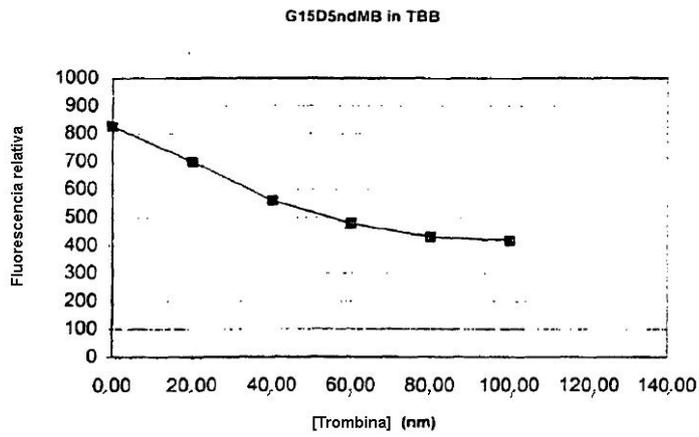


Fig. 20

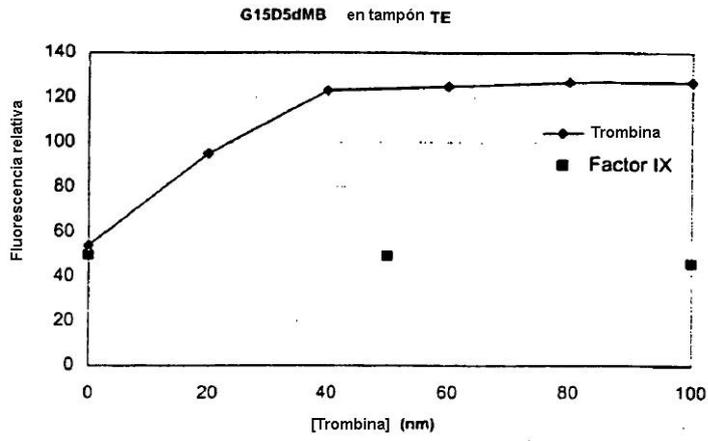


Fig. 21

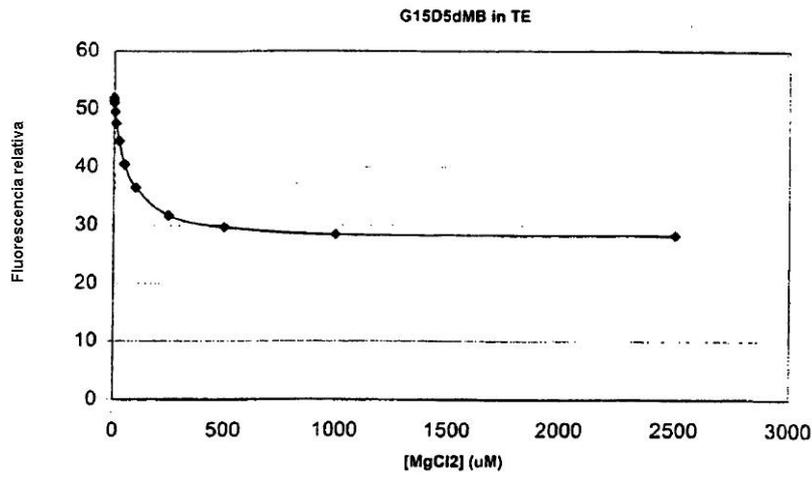


Fig. 22