

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 979**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2011** **E 11798559 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 2582849**

54 Título: **Detección de ácidos nucleicos y proteínas**

30 Prioridad:

21.06.2010 US 819700

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2015

73 Titular/es:

**PHYSICIANS CHOICE LABORATORY SERVICES,
LLC (100.0%)
854 Paragon Way
Rock Hill, SC 29730, US**

72 Inventor/es:

**SHUBER, ANTHONY P. y
CHIU, EUGENE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 530 979 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de ácidos nucleicos y proteínas

Solicitud relacionada

5 La presente descripción reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente de EEUU no provisional n.º de serie 12/819.700, presentada el 21 de junio, 2010, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

La invención se refiere, en general, a métodos para detectar un ácido nucleico diana y una proteína diana en un único ensayo.

10 Antecedentes

15 Los ensayos de diagnóstico basados en múltiples biomarcadores se han empleado solo de un modo limitado. Por ejemplo, se han propuesto ensayos en los que se mide la expresión génica en varios genes para evaluar el estado clínico. Además, se han empleado múltiples análisis de proteínas para seleccionar la presencia de uno cualquiera de múltiples trastornos cuando el diagnóstico no está claro. En general, se utilizan algoritmos para evaluar los resultados de cualquier ensayo convencional y, en particular, para evaluar si son necesarios más ensayos. Sin embargo, puesto que diferentes tipos de biomarcadores proporcionan resultados informativos, la mayoría de los ensayos se han limitado a seleccionar un único marcador o análisis por trastorno.

20 Es habitual seleccionar múltiples análisis procedentes de la misma muestra para diferentes indicaciones clínicas. Esto es especialmente cierto cuando un paciente presenta síntomas ambiguos. Por ejemplo, una única muestra de sangre puede seleccionarse para el hematocrito, el antígeno de la hepatitis, el VIH y el SARS. Sin embargo, cada una de estas selecciones se dirige a un trastorno clínico diferente y está ligado a un algoritmo diferente para producir distintos resultados para cada una de las indicaciones clínicas que pretende medir el marcador. Esta selección amplia se emplea para realizar un descarte en una o más vías de diagnóstico en una situación en la que el diagnóstico es ambiguo o difícil.

25 Si se aumenta el número de biomarcadores en cualquier ensayo de selección, se aumenta también la precisión del diagnóstico. Sin embargo, no existe ningún ensayo que permita la selección y/o el diagnóstico de un trastorno basándose en una pluralidad de biomarcadores. Por tanto, en la técnica son necesarios ensayos y algoritmos de diagnóstico que permitan la selección y el diagnóstico de un trastorno basados en múltiples biomarcadores.

Sumario

30 La invención proporciona métodos para determinar el estado clínico de un paciente. En particular, la invención proporciona métodos para crear una lectura de diagnóstico basada en el análisis de múltiples análisis o biomarcadores. En la práctica, los métodos de la invención proporcionan la capacidad para seleccionar pacientes basándose en una pluralidad de biomarcadores en un único formato de ensayo.

35 Los métodos de la invención son particularmente útiles en la evaluación de diagnósticos complejos. La invención permite el análisis múltiple de una pluralidad de biomarcadores para aumentar el poder de diagnóstico y la precisión del resultado. Según un aspecto de la invención, se evalúa una pluralidad de diferentes biomarcadores obtenidos de la muestra de un paciente. Los resultados después se normalizan y se produce una puntuación de diagnóstico basada en los datos normalizados de los biomarcadores. En una realización preferida, se obtienen los niveles de cada uno de una pluralidad de biomarcadores en la muestra de un paciente. Después, a cada biomarcador se le asigna un resultado binario (por ejemplo, un 1 o un 0) basándose en si el nivel detectado del biomarcador en la muestra del paciente está por encima de un umbral predeterminado. Después, se obtiene una puntuación acumulada añadiendo los resultados binarios para producir una puntuación de diagnóstico que se emplea en la evaluación clínica. En otra realización preferida, los resultados de los biomarcadores se ponderan basándose en criterios de diagnóstico conocidos y/o la historia, el estilo de vida, los síntomas y similares, del paciente. La puntuación ponderada agregada resultante se emplea para la evaluación clínica.

45 En ciertas realizaciones de la invención, no es necesario que la lectura de la pluralidad de biomarcadores sea binaria. Por el contrario, la lectura puede tomar en consideración el valor predictivo de cada uno de los biomarcadores para el trastorno que se está evaluando. Esta es una forma de ponderar basándose en factores de riesgo conocidos, criterios de diagnóstico y la historia del paciente, y puede afinarse para reflejar el grado de confianza esperado del ensayo. Los métodos de la invención permiten la generación de una firma basada en los resultados obtenidos de una pluralidad de biomarcadores, en la que la firma es indicativa de la presencia/ausencia de una enfermedad, el estadio de la enfermedad o factores de pronóstico (tales como la probabilidad de recurrencia, la evaluación de la respuesta al tratamiento, y el riesgo de desarrollar la enfermedad).

Los métodos de la invención emplean la medición de numerosos marcadores diferentes que tienen una relación predictiva o un posible valor predictivo en el diagnóstico, la prognósis, la selección terapéutica, la eficacia terapéutica, el rasgo fisiológico y/o la probabilidad de recurrencia. El poder predictivo de la evaluación de diagnóstico múltiple crea una ventaja significativa en términos de especificidad y sensibilidad del ensayo. El poder predictivo del ensayo reside en su capacidad para obtener resultados de una serie de marcadores diferentes y combinarlos en una única firma de diagnóstico o resultado que incluye el poder predictivo de cada uno de los marcadores individuales para producir un resultado muy sensible y muy específico.

Por consiguiente, en una realización de la invención, se mide una pluralidad de biomarcadores en una muestra obtenida de un paciente. La pluralidad de biomarcadores se selecciona de proteínas (que incluyen anticuerpos, enzimas, etc.), ácidos nucleicos, carbohidratos, azúcares, bacterias, virus, pH, ácidos, bases, vitaminas, iones, hormonas, y fármacos. En algunos casos, por ejemplo en el caso de ácidos nucleicos y proteínas, los niveles de expresión pueden medirse a lo largo del tiempo. En otros casos, los niveles de un biomarcador se obtienen en las unidades que son apropiadas para ese biomarcador. Los niveles pueden normalizarse opcionalmente a través de un panel entero de biomarcadores, o puede asignarse un resultado binario basándose en si se ha sobrepasado o no un umbral.

En algunas realizaciones, los resultados de un panel de biomarcadores se emplean en una selección de diagnóstico tal cual se obtienen de un ensayo individual de los diversos biomarcadores. En otros casos, la normalización se produce antes de la determinación del diagnóstico, y en otros casos, los resultados de los biomarcadores simplemente son asignados a una unidad binaria (por ejemplo, un 1 o un 0). Después se evalúan los resultados acumulados basándose en una entrada binaria acumulada (es decir, la suma de todos los 1 y 0), o basándose en las medias ponderadas, o basándose en una firma generada por el panel de marcadores elegidos.

Los marcadores elegidos para los ensayos de diagnóstico múltiple de la invención se eligen basándose en su valor predictivo o su presunto valor predictivo para el trastorno o trastornos que se están diagnosticando. Los marcadores concretos se seleccionan basándose en diversos criterios de diagnóstico, tales como la presunta asociación con una enfermedad. El número de marcadores elegidos se deja al criterio del usuario y depende de la capacidad predictiva acumulada de los marcadores y la especificidad/sensibilidad de los marcadores individuales en el panel. Puede elegirse un panel de marcadores para aumentar la eficacia del diagnóstico, pronóstico, respuesta al tratamiento y/o recurrencia. Además de los problemas generales en torno a la especificidad y la sensibilidad, los marcadores también pueden elegirse tomando en consideración la historia y el estilo de vida del paciente. Por ejemplo, otras enfermedades que el paciente tenga, pueda tener o haya tenido pueden afectar a la elección del panel de biomarcadores que se va a analizar. Los fármacos que el paciente tenga en su sistema también pueden afectar a la selección del panel.

La invención es aplicable al diagnóstico y el control de cualquier enfermedad, en poblaciones de pacientes sintomáticos o asintomáticos. Por ejemplo, la invención puede utilizarse para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, enfermedades hereditarias y otros trastornos, tales como una enfermedad o lesión provocada por el abuso de fármacos o alcohol. La invención también puede aplicarse a la evaluación de la eficacia terapéutica, el potencial de la recurrencia de una enfermedad, o la propagación (por ejemplo, metástasis).

La invención es especialmente útil en la selección para el cáncer. Los ejemplos de biomarcadores asociados con el cáncer incluye la metaloproteinasa de matriz (MMP), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), el complejo de MMP/NGAL, timosina β 4, timosina β 10, timosina β 15, producto del gen similar al colágeno (CLG), prohibitina, glutatión-S-transferasa, beta-5-tubulina, ubiquitina, tropomiosina, Cyr61, cistatina B, chaperonina 10 y profilina. Los ejemplos de MMP incluyen, sin limitación, MMP-2, MMP-9, complejo de MMP9/NGAL, complejo de MMP/TIMP, complejo de MMP/TIMP1, ADAMTS-7 o ADAM-12, entre otros. Asimismo, la muestra del paciente a partir de la cual se obtiene un biomarcador es irrelevante para el funcionamiento de la invención. Las fuentes de muestras preferidas incluyen sangre, suero, esputo, heces, saliva, orina, fluido cerebroespinal, aspirado de pezón, y pus.

Los métodos de la invención pueden usarse en pacientes que se sabe que tienen una enfermedad, o pueden usarse para seleccionar sujetos sanos de un modo periódico. Un sujeto puede seleccionarse para una o más enfermedades simultáneamente empleando los métodos de la invención. La selección se puede realizar de forma regular (por ejemplo, semanalmente, mensualmente, anualmente, o en otro intervalo de tiempo); o como un evento puntual. El resultado del análisis puede usarse para alterar la frecuencia y/o el tipo de protocolos de selección, diagnóstico y/o tratamiento. Se pueden seleccionar diferentes trastornos a diferentes intervalos de tiempo y en función de diferentes factores de riesgo (por ejemplo, edad, peso, género, historia de fumador, historia familiar, riesgos genéticos, exposición a toxinas y/o carcinógenos, etc., o una combinación de los mismos). El criterio del médico o técnico determinará el régimen de selección particular y la elección de los marcadores empleados en conexión con la invención.

Los valores umbral para cualquier biomarcador particular y la enfermedad asociada se determinan haciendo referencia a la bibliografía o a criterios de estándares de cuidados, o pueden determinarse empíricamente. En una realización preferida de la invención, los umbrales para su uso en asociación con los paneles de biomarcadores de la invención se basan en valores predictivos positivos y negativos asociados con los niveles umbral del marcador. En

un ejemplo, los marcadores se eligen para proporcionar 100% de valor predictivo negativo; en otras palabras, no se espera que los pacientes que tienen unos valores para un número suficiente de marcadores (que pueden ser solo uno) por debajo de los valores umbral asignado tengan la enfermedad para la cual se está llevando a cabo la selección y puede determinarse, sin ambigüedad, que no necesitan una mayor intervención en ese momento. A la inversa, los valores umbral puede ajustarse de modo que se logre un valor predictivo positivo de aproximadamente 100%. En este caso, un número crítico de niveles de biomarcadores por encima de ese umbral se asocia, sin ambigüedad, con la necesidad de una intervención. Tal como será evidente para los expertos en la técnica, para ciertos biomarcadores no es necesario que los valores predictivos positivos y negativos estén al 100%, sino que pueden ser algo menores dependiendo de otros factores, tales como la historia genética o predisposición del paciente, la salud global, la presencia o ausencia de otros marcadores para enfermedades, etc.

Otros aspectos y características de la invención serán evidentes tras la revisión de la siguiente descripción detallada de la misma.

Descripción detallada

La invención proporciona métodos para la evaluación clínica, en los que un panel de diferentes biomarcadores obtenidos de una muestra de tejido o de un fluido corporal de un paciente se analiza y se agrega para producir un resultado clínicamente informativo. El resultado de emplear los métodos de la invención es un mayor registro y potencia de diagnóstico.

Según la invención, se obtienen múltiples biomarcadores a partir de la muestra de un paciente (por ejemplo, muestras de tejido o de un fluido corporal). Los niveles de los diversos marcadores se determinan de modo apropiado y se produce un resultado acumulado de diagnóstico/prognóstico. Puede elegirse cualquiera de una serie de biomarcadores diferentes basándose en el trastorno o trastornos que se están seleccionando. En muchos casos, por ejemplo, en el cáncer, se seleccionan mutaciones, niveles de expresión, patrones de metilación y similares de ácidos nucleicos, en coordinación con niveles de proteínas. En un ejemplo alternativo, pueden seleccionarse esteroides u hormonas de proteínas, junto con otros tipos de marcadores y puede producirse una "puntuación" de diagnóstico agregada. Otras combinaciones de marcadores serán evidentes para los expertos en la técnica y dependerán de la enfermedad o el trastorno para el cual se está llevando a cabo la selección.

La invención permite el uso de diferentes analitos o biomarcadores en un único algoritmo de diagnóstico para aumentar el poder predictivo. Según la invención, se miden múltiples analitos y los resultados medidos se convierten en una única puntuación de lectura o una firma que es predictiva del resultado clínico. La lectura puede ser binaria (por ejemplo, 1/0, sí/no), o puede ser un punto de un continuo que representa un grado de riesgo o gravedad de una enfermedad, o un resultado probable (por ejemplo, de un tratamiento, recurrencia, etc.). En cualquiera de estos casos, la lectura se correlaciona con resultados predictivos a un nivel deseado de confianza. Por ejemplo, tras el análisis de múltiples analitos, puede generarse una firma basándose en el patrón de resultados obtenidos para el panel seleccionado. Esta firma después se correlaciona con un resultado clínico basándose en la comparación con un conjunto de entrenamiento con el mismo panel, o basándose empíricamente en resultados anteriores. La determinación de los resultados del analito individual también puede transformarse en un formato de código de barras que pueda estructurarse para que se correlacione con un resultado clínico. Los resultados de ensayos individuales pueden ponderarse o no, y pueden normalizarse o no dependiendo de las necesidades del resultado global.

Como ejemplo, un aspecto de la invención proporciona un algoritmo binario en el que se realizan mediciones de ADN y proteínas para proporcionar una lectura de diagnóstico. En este ejemplo, se realiza un ensayo para determinar si existe una mutación en una región genómica de la cual se sabe que está asociada con el cáncer. Por ejemplo, primero se determina el polimorfismo de un único nucleótido que se sabe que es predictivo de la aparición de una enfermedad. Existen numerosos medios para realizar esto, tales como ensayos de extensión de una sola base (por ejemplo, patente de EEUU n.º 6.566.101, incorporada como referencia en la presente). Se obtiene un resultado que indica si la mutación está o no presente (1 o 0). También pueden medirse varias otras mutaciones del ADN y se las puede asignar, de modo similar, una puntuación binaria para la asociación a una enfermedad. Pueden realizarse tantos ensayos basados en mutaciones como se desee. También se mide el nivel de una proteína o proteínas que se sabe que son reveladoras del cáncer. Una de estas puede ser, por ejemplo, el supresor de tumor p53. Se determina si el nivel de esta proteína sobrepasa una cantidad umbral conocida por ser indicativa de la presencia de una enfermedad. A este analito también se le asigna un resultado binario (por ejemplo, 1 si se sobrepasa un umbral, y 0 si no). Por último, se realiza un ensayo de ARN cuantitativo para determinar el nivel o niveles de ARN diagnósticamente pertinente expresado en la muestra. Se obtiene un resultado binario basado en los niveles de expresión obtenidos para cada especie de ARN medida, y se compara con umbrales asociados a enfermedades conocidos. El resultado de todos estos ensayos es una serie de resultados binarios que forman una lectura de tipo código de barras a la que se le asigna un estado clínico basándose en determinaciones a priori de asociación con una enfermedad para el panel de marcadores entero.

En otro aspecto de la invención, cada uno de los biomarcadores ensayados produce un resultado cuantitativo al que también se le asigna un valor ponderado basándose en la cantidad de analito presente en la muestra con relación a un umbral predeterminado para el marcador. Para cada marcador, un resultado por encima del límite de exclusión

obtiene una puntuación positiva ponderada (en este caso, basada en la cantidad presente en exceso del límite de exclusión), y los que estén por debajo del umbral obtienen una puntuación negativa ponderada. Las puntuaciones ponderadas después se evalúan para proporcionar una lectura de diagnóstico global.

- 5 Existen numerosos métodos para determinar umbrales para su uso en la invención, que incluyen la referencia a valores patrón de la bibliografía o estándares de cuidados asociados. Los umbrales precisos elegidos son irrelevantes, con la condición de que presenten la asociación deseada con el resultado de diagnóstico.

De forma similar, el biomarcador elegido es irrelevante para la operación de la invención, con la condición de que el marcador esté asociado a la enfermedad para la cual se está llevando a cabo la selección. Algunos biomarcadores que se han asociado con enfermedades incluyen marcadores de ácidos nucleicos (que incluyen, pero no se limitan a

10 K-ras, K-ras2, APC, DCC, TP53, PRC I, NUSAPI, CAPZ, PFKP, EVER1, FLT1, ESPL I, AKAP2, CDC45L, RAMP, SYNGR2, NDRG1, ZNF533, y un ácido nucleico hipermetilado), proteínas y péptidos, carbohidratos, azúcares, glicanos, lípidos, hormonas (por ejemplo, hormona antidiurética (ADH), hormona adrenocorticotrófica (ACTH), hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), estrógeno (estradiol, estrona, estriol), progesterona, testosterona, dihidrotestosterona (DHT), inhibina, somatotropina, deshidroepiandrosterona (DHEA), somatostatina, glucagón, insulina, tiotropina, hormona estimulante de la

15 tiroides (TSH), tiroxina, hormona paratiroidea, corticotropina, cortisol, corticosterona, aldosterona, epinefrina, norepinefrina, prolactina, vasopresina, oxitocina, hormona estimulante de melanocitos (MSH)), factores del crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor del crecimiento nervioso (NGF), neurotrofinas, factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), miostatina (GDF-8), factor de diferenciación del crecimiento (GDF-9), factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2), factor del crecimiento de fibroblastos ácido, receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de células pluripotenciales humanas (SCF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de necrosis tumoral- β (TNF- β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor del crecimiento transformante- β (TGF- β), factor del crecimiento transformante- α (TGF- α), factor del crecimiento similar a insulina-I (IGF-II), factor del crecimiento similar a insulina-II (IGF-II), y factor estimulante de colonias (CSF)), citoquinas (por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IFN- α , IFN- β , e IFN- γ), proteínas (por ejemplo, metaloproteinasas de matriz (MMP), tales como MMP2, MMP9, lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), complejo de

20 MMP/NGAL, timosina β 15, timosina β 16, producto del gen similar al colágeno (CLG), prohibitina, glutatión-S-transferasa, beta-5-tubulina, ubiquitina, tropomiosina, Cyr61, cistatina B, chaperonina 10, profilina, alfa-fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, receptor del factor del crecimiento epidérmico, calcireína 3 (antígeno específico de próstata), factor del crecimiento endotelial vascular A, VEGF, albúmina, CA 125, calcitonina, cromogranina A (proteína secretoria paratiroidea 1), ACTH que contiene corticotropina-lipotropina, receptor de estrógeno 1, gastrina, receptor de progesterona, prolactina, cadena alfa de S100, somatostatina, tiroglobulina, V-erb-b2, Her2/neu, antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67, CLUlinfoma 2 de células B, proteína X asociada a BCL2, beta-2-microglobulina, cáncer de mama 1 de aparición temprana, BRCA1, CA 15.3, CA 19.9, E-cadherina de tipo 1 cadherina 1 (epitelial), caspasa 3, antígeno CD44, antígeno tumoral celular p53, factor de coagulación II, protrombina, factor estimulante de colonias 2 (granulocitos-macrófagos), factor estimulante de colonias 3 (granulocitos), proteína reactiva C, ciclina D1, inhibidor de quinasas dependiente de ciclina 1, p21, eritropoyetina, cadena alfa/alfa-E de fibrinógeno, hormona estimulante del folículo, gamma-enolasa, insulina, gamma-interferón, interleuquina 2, interleuquina 6, k-ras, nepriliasina, CD 10, transferrina, tripsina, factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), miembro 6 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, fas, factor de Von Willebrand, quimioquina, proteína 1 similar a quitinasa-3, YKL-40, cadena beta de coriagonadotropina, factor estimulante de colonias 1 (macrófagos), haptoglobina-1, factor del crecimiento de hepatocitos, inhibina, cadena alfa del receptor de alfa/beta-interferón, cadena beta del receptor de alfa/beta-interferón, calcireína 10, calcireína 11, calcireína 6, metaloproteína de matriz 3, ADAM-12, citoquina inducible pequeña A21 (CCL21) soluble IL-2R alfa, factor del crecimiento de somatotropina, hormona del crecimiento, cáncer de mama 2 de aparición temprana, BRCA2, beta-catenina 1, catepsina D, CD15, desmina, ADN-(sitio apurínico o apirimidínico) liasa, APEX, cadena beta de lutropina,

25 hormona luteinizante, hormona paratiroidea, antígeno nuclear de células en proliferación, miembro 8 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (ligando CD30), homólogo del oncogén vírico de mielocitomatosis V-myc (aviar), miembro 8 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (CD30), 17beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (17HSD1), fosfatasa ácida de la próstata, adrenomedulina, aldolasa A, fosfatasa alcalina específica de hueso, fosfatasa alcalina, tipo placentario, glicoproteína 1 alfa-1-ácida, orosomucoide, alfa-1-antitripsina, alfa-2-H S-glicoproteína, alfa-2-macroglobulina, alfa-lactalbumina, familia 5 de angiogenina ribonucleasa ARNasa A, angiopoyetina 1, angiopoyetina 2, antileucoproteína 1, SLPI, apolipoproteína A1, apolipoproteína A-II, apolipoproteína C-1, apolipoproteína C-III, sialoproteína de hueso II, factor neurotrófico derivado del cerebro, supresor 1 de la metástasis de cáncer de mama, CA 27.29, CA 72-4, catepsina B, CC quimioquina 4, HCC-4, V5 variante de CD44 soluble, ceruloplasmina, proteína p40 del protooncogén del cáncer cervical 1, ligando 4 de quimioquina (motivo C-C), citoquina inducible pequeña A4 (CCL4), MIP-1-beta, claudina-3, claudina-4, clusterina, factor de coagulación III, cadena A del factor de coagulación XIII, cadena B del factor de coagulación XIII, telopéptido c-terminal del colágeno I, componente 3 del complemento, componente 4 del complemento, componente 7 del complemento, proteína relacionada con el factor H del complemento, quinasa dependiente de ciclina 6, ciclooxigenasa-2, cistatina A, cistatina B, cistatina C, citoqueratina 8, inhibidor de la unión

30

35

40

45

50

55

60

de diazepam, endoglina, endotelina 1, factor del crecimiento epidérmico, E-selectina, ferritina H, factor del crecimiento de fibroblastos 2 (básico), fibronectina 1, ligando Flt-3, tirosina quinasa 1 relacionada con Fms, VEGFR1, folistatina, fructosa-bisfosfato aldolasa B, fructosa-bisfosfato aldolasa C, geminina, glucosa-6-fosfato isomerasa, glipicano-3, n-terminal, alfa inducible por la detención del crecimiento y los daños en el ADN, proteína ácida inmunosupresora, factor del crecimiento similar a insulina 1 (somatomedina C), factor del crecimiento similar a insulina 2 (somatomedina A), proteína de unión al factor del crecimiento similar a insulina 1, proteína de unión al factor del crecimiento similar a insulina 2, proteína de unión al factor del crecimiento similar a insulina 3, molécula de adhesión intercelular 1, interferón-alfa 1, interleuquina-1-alfa, interleuquina-1-beta, interleuquina 10, interleuquina 12A, interleuquina 16, interleuquina 5, receptor de interleuquina 6, transductor de señales de interleuquina 6, interleuquina 7, interleuquina 8, interleuquina 9, proteína antagonista del receptor de interleuquina-1, IRAP, caliceína 14 (hK14), caliceína 2 prostática, caliceína 5, caliceína 7, caliceína 8, caliceína 18, caliceína 8, queratina 18, queratina, citoesquelético 19 de tipo I, citoqueratina 19, ligando Kit, lactotransferrina, leptina, L-selectina, receptor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante, proteína de unión a Mac-2 90K, mamaglobina B, suero mamario, antígeno, receptor del crecimiento de células cebadas/pluripotenciales, actividad inhibidora de melanoma, proteína del cofactor de membrana, antígeno CD46, mesotelina, midquina, proteína MK-1, Ep-CAM, proteína de determinación de mioblastos 1, factor del crecimiento nervioso-beta, netrina-1, proteína secretora neuroendocrina-55, defensina de neutrófilos 1, defensina de neutrófilos 3, Nm23-H 1, OVX1, OX40, proteína oncofetal p65, inhibidor de tripsina secretora pancreática, TATI, proteína relacionada con la hormona paratiroidea, Pcaf, factor asociado a P300/CBP, pepsinógeno-1, proteína de tejido específica placentaria 12, proteína de unión a retinol plasmático, plasminógeno (contiene angiostatina), molécula de adhesión a células endoteliales de plaquetas, PECAM-1, factor de plaquetas 4, polipéptido beta del factor del crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido alfa del receptor factor del crecimiento derivado de plaquetas, proteína de la zona de embarazo, proteína A plasmática asociada al embarazo, proteína secretora de la próstata PSP94, P-selectina, proteína de unión a PSP94, piruvato quinasa, isozimas M1/M2, proteína vehículo de riboflavina, cadena beta de 100, fosfoproteína 1 segregada, osteopontina, inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado B, maspina, inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa, clado E, PAI-1, alfa-amiloide-1 sérico, paraoxonasa/arilesterasa sérica 1, citoquina inducible pequeña A14 CCL14, citoquina inducible pequeña A18(CCL18), MIP-4, citoquina inducible pequeña A2(CCL2), citoquina inducible pequeña A3(CCL3), proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa, citoquina inducible pequeña B5(CXCL5), antígeno de carcinoma de células escamosas 1, antígeno de carcinoma de células escamosas 2, survivina, sindecano-1, sinucleína-gamma, tirosina quinasa endotelial TEK, Tie-2, tenascina, tetranectina, receptor de TGF-beta de tipo III, tirredoxina reductasa 1, trombopoyetina, trombopoyetina 1, timidina quinasa, inhibidor tisular de metaloproteinasa I, inhibidor tisular de metaloproteinasa 2, activador de plasminógeno de tipo tisular, tPA, receptor de transferrina (p90 CD71), factor del crecimiento transformante alfa, factor del crecimiento transformante beta 1, transtiretina, cadena alfa de tropomiosina 1 (alfa-tropomiosina), miembro 5 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), CD154, miembro 6 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), ligando Fas, miembro 13B de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, TALL-1, miembro 11B de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, osteoprotegerina, miembro 1A de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, p60 TNF-RI p55 CD120a, TNFR1, miembro 1B de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, TNFR2, receptor de superficie del activador de plasminógeno uroquinasa, U-PAR, molécula de adhesión de células vasculares 1, receptor del factor del crecimiento endotelial vascular , péptido intestinal vasoactivo, VEGF(165)b, proteína C dependiente de vitamina K, vitronectina, y proteína-1 de unión a la caja X), anticuerpos, o cualquiera de sus combinaciones.

En otro aspecto de la invención, se emplea un único ensayo para detectar ácidos nucleicos y proteínas de una única muestra. Las muestras biológicas habitualmente no incluyen una cantidad suficiente de ADN para la detección. Una técnica habitual empleada para aumentar la cantidad de ácidos nucleicos en una muestra es realizar una PCR con la muestra antes de realizar el ensayo que detecta los ácidos nucleicos en la muestra. Una PCR implica una ciclación térmica, que consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos de una reacción para la fusión del ADN y la replicación enzimática del ADN. La mayoría de los protocolos de PCR implican calentar el ADN para desnaturar el ADN bicatenario en la muestra, enfriar el ADN para permitir la asociación de los cebadores al ADN monocatenario para formar complejos de ADN/cebador, y la unión de una ADN polimerasa a los complejos de ADN/cebador, y el recalentamiento de la muestra, de modo que la ADN polimerasa sintetice una nueva hebra de ADN complementaria con el ADN monocatenario. Este proceso amplifica el ADN en la muestra y produce una cantidad de ADN suficiente para su detección mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como transferencias Southern o secuenciación.

Un problema con la detección de ácidos nucleicos y proteínas a la vez en un único ensayo es que las temperaturas empleadas para la PCR afectan de modo adverso a las proteínas en la muestra, haciendo que las proteínas sean indetectables mediante los métodos conocidos en la técnica, tales como transferencias Western. Por ejemplo, la etapa de calentamiento necesaria en una reacción de PCR lleva la muestra a una temperatura que puede producir la desnaturación irreversible de las proteínas en la muestra y/o la precipitación de las proteínas de la muestra. Además, la ciclación térmica, es decir, el calentamiento y el enfriamiento repetido, puede provocar que las proteínas en la muestra adopten una estructura terciaria no nativa. Tras haber sido desnaturadas, las proteínas normalmente no pueden detectarse mediante ensayos de proteínas convencionales, tales como transferencias Western, inmunoprecipitación, o inmunoelectroforesis. Por tanto, es necesario un único ensayo que pueda analizar tanto las proteínas como los ácidos nucleicos en una muestra.

Los métodos de la presente invención pueden detectar un ácido nucleico diana y una proteína diana en un único ensayo. En ciertas realizaciones, los métodos de la invención se logran añadiendo un aptámero a una muestra que se une a una proteína diana en la muestra para formar un complejo de aptámero/proteína. Un aptámero (ligando de ácido nucleico) es una macromolécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que se une con fuerza a una diana molecular específica, tal como una proteína. Puesto que un aptámero está compuesto por ADN o ARN, puede amplificarse con una PCR y puede detectarse mediante ensayos de ácidos nucleicos convencionales. Después se emplea una PCR para amplificar los ácidos nucleicos y el aptámero en la muestra. Los ácidos nucleicos y el aptámero amplificados después pueden detectarse empleando técnicas convencionales para detectar ácidos nucleicos que son conocidas en la técnica. La detección del aptámero en la muestra indica la presencia de la proteína diana en la muestra.

Tal como se emplea en la presente, "aptámero" y "ligando de ácido nucleico" se emplean de modo intercambiable para indicar un ácido nucleico que tiene una afinidad de unión específica por una molécula diana, tal como una proteína. Al igual que todos los ácidos nucleicos, un ligando de ácido nucleico concreto puede describirse mediante una secuencia lineal de nucleótidos (A, U, T, C y G), generalmente con una longitud de 15-40 nucleótidos. Los ligandos de ácidos nucleicos pueden modificarse para que codifiquen la secuencia complementaria de una proteína diana con la que se sabe que se asocia cuando está presente o no una enfermedad específica.

En disolución, la cadena de nucleótidos forma interacciones intramoleculares que pliegan la molécula en una forma tridimensional compleja. La forma del ligando de ácido nucleico permite que se una con fuerza a la superficie de su molécula diana. Además de mostrar un notable especificidad, los ligandos de ácidos nucleicos generalmente se unen a sus dianas con una afinidad muy alta, por ejemplo, la mayoría de los ligandos de ácidos nucleicos antiproteínas tienen unas constantes de disociación en equilibrio en el intervalo de picomolar a nanomolar bajo.

Los aptámeros empleados en los métodos de la invención dependen de la proteína diana que se va a detectar. Los ligandos de ácidos nucleicos para proteínas diana específicas pueden descubrirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, los ligandos de ácidos nucleicos se descubren empleando un proceso de selección *in vitro* denominado SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment", evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial). Véase, por ejemplo, Gold *et al.* (patentes de EEUU n.º 5.270.163 y 5.475.096), cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. SELEX es un proceso iterativo empleado para identificar un ligando de ácido nucleico que se une a una diana molecular elegida procedente de un gran agrupamiento de ácidos nucleicos. El proceso se basa en técnicas convencionales de la biología molecular, empleando múltiples rondas de selección, reparto y amplificación de ligandos de ácidos nucleicos para resolver los ligandos de ácidos nucleicos con la mayor afinidad por una molécula diana. El método SELEX incluye la identificación de ligandos de ácidos nucleicos de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren mejores características al ligando, tal como una mayor estabilidad *in vivo* o mejores características de transporte. Los ejemplos de estas modificaciones incluyen sustituciones químicas en posiciones de la ribosa y/o el fosfato y/o la base. Se han producido numerosas mejoras en el método SELEX básico, cualquiera de las cuales puede emplearse para descubrir ligandos de ácidos nucleicos para su uso en los métodos de la invención.

En los métodos de la invención, los aptámeros se introducen en la muestra para que se unan a la proteína diana. Ciertos aptámeros se unen a la proteína o proteínas de interés en la muestra para formar complejos de aptámero/proteína. Los aptámeros no unidos después se separan y/o se retiran de la muestra empleando métodos convencionales conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Schneider *et al.*, solicitud de patente de EEUU n.º 2009/0042206, cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente en su totalidad.

La amplificación se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico. Véase, por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1995), cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. La reacción de amplificación puede ser cualquier reacción de amplificación conocida en la técnica que amplifique moléculas de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, la reacción en cadena de la polimerasa anidada, la reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de conformación monocatenario, la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación por desplazamiento de hebra y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

En ciertos métodos de la invención, el ácido nucleico diana y el ligando de ácido nucleico se amplifican mediante PCR. La PCR se refiere a los métodos de K. B. Mullis (patentes de EEUU n.º 4.683.195 y 4.683.202, incorporadas en la presente como referencia) para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. El proceso para amplificar la secuencia de ácido nucleico diana y el ligando de ácido nucleico incluye introducir un exceso de cebadores oligonucleotídicos que se unen al ácido nucleico y al ligando de ácido nucleico, seguido de una secuencia precisa de ciclación térmica en presencia de una ADN polimerasa. Los cebadores son complementarios con sus respectivas hebras del ácido nucleico diana y ligando de ácido nucleico.

Para realizar la amplificación, la mezcla de cebadores se asocia con sus secuencias complementarias dentro del ácido nucleico diana y ligando de ácido nucleico. Después de la asociación, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar una nueva pareja de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, asociación

de cebadores y extensión con polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, la desnaturalización, la asociación y la extensión constituyen un ciclo; puede haber numerosos ciclos) para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la diana y el ligando de ácido nucleico deseados. La longitud del segmento amplificado de la diana y el ligando de ácido nucleico deseados se determina mediante las posiciones relativas de los cebadores con respecto a los demás y, por tanto, esta longitud es un parámetro controlable.

Con la PCR es posible amplificar una única copia de una secuencia diana específica en el ADN genómico hasta un nivel en el que pueda detectarse mediante varias metodologías diferentes (por ejemplo, tinción, hibridación con una sonda marcada, incorporación de cebadores biotinilados seguido de la detección del conjugado de avidina-enzima, la incorporación de desoxinucleótidos trifosfato marcados con ³²P, tales como dCTP o dATP, en el segmento amplificado).

En una realización de la invención, el ácido nucleico diana y el ligando de ácido nucleico pueden detectarse empleando sondas marcadas de modo detectable. El diseño de las sondas de ácidos nucleicos y los métodos para sintetizar sondas oligonucleotídicas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, DNA microarray: A Molecular Cloning Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (2003), o Maniatis, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982), cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989), o F. Ausubel *et al.*, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1987), cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. También se describen métodos adecuados para sintetizar sondas oligonucleotídicas en Caruthers, Science, 230:281-285, (1985), cuyo contenido se incorpora como referencia.

Las sondas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen las formadas a partir de ácidos nucleicos, tales como ARN y/o ADN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, ácidos nucleicos modificados, y sondas quiméricas de una clase mixta que incluye un ácido nucleico con otro componente orgánico, tal como ácidos nucleicos peptídicos. Las sondas pueden ser monocatenarias o bicatenarias. Los ejemplos de análogos de nucleótidos incluyen ésteres fosfato de desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, desoxitimidina, adenosina, citidina, guanosina, y uridina. Otros ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen xantina o hipoxantina; 5-bromouracilo, 2-aminopurina, desoxiinosina, o citosina metilada, tal como 5-metilcitosina, y N4-metoxidesoxicitosina. También se incluyen bases de miméticos polinucleotídicos, tales como ácidos nucleicos metilados, por ejemplo, 2'-O-metARN, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos peptídicos modificados, y cualquier otro resto estructural que pueda actuar sustancialmente como un nucleótido o una base, por ejemplo, mostrando complementariedad de bases con una o más bases que aparecen en el ADN o ARN.

La longitud de la sonda oligonucleotídica no es crítica, con la condición de las sondas sean capaces de hibridarse con el ácido nucleico diana y el ligando de ácido nucleico. De hecho, las sondas pueden tener cualquier longitud. Por ejemplo, las sondas pueden tener tan pocos como 5 nucleótidos, o tantos como 5000 nucleótidos. Los ejemplos de sondas son 5-meros, 10-meros, 15-meros, 20-meros, 25-meros, 50-meros, 100-meros, 200-meros, 500-meros, 1000-meros, 3000-meros, o 5000-meros. Los métodos para determinar una longitud de sonda óptima son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shuber, patente de EEUU n.º 5.888.778, incorporada en la presente como referencia en su totalidad.

Las sondas utilizadas para la detección pueden incluir un marcador detectable, tal como un radiomarcador, un marcador fluorescente, o un marcador enzimático. Véase, por ejemplo, Lancaster *et al.*, patente de EEUU n.º 5.869.717, incorporada en la presente como referencia. En ciertas realizaciones, la sonda está marcada de modo fluorescente. Los nucleótidos marcados de forma fluorescente pueden producirse mediante diversas técnicas, tales como las descritas en Kambara *et al.*, Bio/Technol., 6:816-821 (1988); Smith *et al.*, Nucl. Acid Res., 13:2399-2412 (1985); y Smith *et al.*, Nature, 321:674-679, (1986), cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. El tinte fluorescente puede unirse a la desoxirribosa mediante un brazo conector que pueda escindirse con facilidad por medios químicos o enzimáticos. Existen numerosos conectores y métodos para unir marcadores a nucleótidos, tal como se muestra en Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991); Zuckerman *et al.*, Polynucleotides Res., 15:5305-5321 (1987); Sharma *et al.*, Polynucleotides Res., 19:3019 (1991); Giusti *et al.*, PCR Methods and Applications, 2:223-227 (1993); Fung *et al.* (patente de EEUU n.º 4.757.141); Stabinsky (patente de EEUU n.º 4.739.044); Agrawal *et al.*, Tetrahedron Letters, 31:1543-1546 (1990); Sproat *et al.*, Polynucleotides Res., 15:4837 (1987); y Nelson *et al.*, Polynucleotides Res., 17:7187-7194 (1989), cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Existen indicaciones precisas en la bibliografía para derivatizar moléculas de fluoróforos y extintores para la unión covalente a través de grupos reactivos comunes que pueden añadirse a un nucleótido. También existen muchos restos conectores y métodos para unir restos de fluoróforos a nucleótidos, según se describe en Oligonucleotides and Analogues, supra; Guisti *et al.*, supra; Agrawal *et al.*, supra; y Sproat *et al.*, supra.

El marcador detectable unido a la sonda puede ser directa o indirectamente detectable. En ciertas realizaciones, el marcador exacto puede seleccionarse basándose, al menos en parte, en el tipo concreto de método de detección empleado. Los ejemplos de métodos de detección incluyen la detección radiactiva, la detección por absorbancia óptica, por ejemplo, la detección por la absorbancia de UV-visible, la detección de emisión óptica, por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia; dispersión Raman. Los marcadores preferidos incluyen

5 marcadores ópticamente detectables, tales como marcadores fluorescentes. Los ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen, pero no se limitan a ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilben-2,2'-disulfónico; acridina y derivados: acridina, isotiocianato de acridina; ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico (EDANS); 4-amino-N-[3-vinilsulfonyl]fenil]naftalimida-3,5-disulfonato; N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; BODIPY; alexa; fluoresceína; multitintes conjugados-dyes; amarillo brillante; cumarina y derivados; cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (cumarano 151); tintes de cianina; cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5'5"-dibromopirogalolsulfonaftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriammina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidroestilben-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilben-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftalen-1-sulfonylo (DNS, cloruro de dansilo); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados; eosina, isotiocianato de eosina, eritrosina y derivados; eritrosina B, isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados; 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, QFITC, (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de verde de malaquita; 4-metilumbeliferona-orto-cresoltaleína; nitrotirosina; pararosanilina; rojo de fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados: pireno, butirato de pireno, succinimidil-1-pireno; puntos cuánticos de butirato; rojo reactivo 4 (Cibacron.TM. rojo brillante 3B-A); rodamina y derivados: 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), cloruro de sulfonylo de lisamina-rodamina B (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101, derivado de cloruro de sulfonylo de sulforrodamina 101 (rojo de Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametilrodamina; isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico; derivados de quelado de terbio; tintes Atto, Cy3; Cy5; Cy5.5; Cy7; IRD 700; IRD 800; azul La Jolla; ftalocianina; y naftalocianina. La invención contempla marcadores distintos de los marcadores fluorescentes, que incluyen otros marcadores ópticamente detectables.

25 La detección de una sonda unida puede medirse empleando cualquiera de una diversidad de técnicas que dependen del marcador utilizado, tales como las conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de métodos de detección incluyen la detección radiactiva, la detección por absorbancia óptica, por ejemplo, la detección por la absorbancia de UV-visible, la detección de emisión óptica, por ejemplo, fluorescencia o quimioluminiscencia. Los dispositivos capaces de detectar la fluorescencia de una única molécula incluyen el microscopio de túnel de barrido (siM) y el microscopio de fuerza atómica (AFM). También pueden barse patrones de hibridación empleando una cámara CCD (por ejemplo, modelo TE/CCD512SF, Princeton Instruments, Trenton, N.J.) con la óptica adecuada (Ploem, en *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity* Mason, T. G. ed., Academic Press, London, pp. 1-11 (1993)), tal como se describe en Yershov *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:4913 (1996), o pueden formarse imágenes mediante monitores de TV. Para las señales radiactivas puede utilizarse un dispositivo Phosphorimager (Johnston *et al.*, *Electrophoresis*, 13:566 1990; Drmanac *et al.*, *Electrophoresis*, 13:566, 1992, 1993). Otros suministradores comerciales de instrumentos de formación de imágenes incluyen General Scanning Inc. (Watertown, Mass., en la web en genscan.com), Genix Technologies (Waterloo, Ontario, Canadá, en la web en confocal.com), y Applied Precision Inc.

40 En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana o el ligando de ácido nucleico o ambos se cuantifican empleando métodos conocidos en la técnica. Un método preferido para la cuantificación es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR). Tal como se emplea en la presente, "QPCR" se refiere a una reacción de PCR realizada de tal forma y bajo unas condiciones controladas de modo que los resultados del ensayo sean cuantitativos, es decir, el ensayo es capaz de cuantificar la cantidad o la concentración de un ligando de ácido nucleico presente en la muestra de ensayo.

45 La QPCR es una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa, y se emplea para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ácido nucleico diana. La QPCR permite la detección y la cuantificación (como un número absoluto de copias o una cantidad relativa cuando se normaliza para la entrada de ADN u otros genes normalizantes adicionales) de una secuencia específica en una muestra de ADN. El procedimiento sigue el principio general de la PCR, con la característica adicional de que el ADN amplificado se cuantifica a medida que se acumula en la reacción en tiempo real después de cada ciclo de amplificación. La QPCR se describe, por ejemplo, en Kurnit *et al.* (patente de EEUU n.º 6.033.854), Wang *et al.* (patentes de EEUU n.º 5.567.583 y 5.348.853), Ma *et al.* (*The Journal of American Science*, 2(3) (2006)), Heid *et al.* (*Genome Research*, 986-994, (1996)), Sambrook y Russell (*Quantitative PCR, Cold Spring Harbor Protocols* (2006)), e Higuchi (patentes de EEUU n.º 6.171.785y 5.994.056). Sus contenidos se incorporan como referencia en la presente en su totalidad.

55 Dos métodos habituales de cuantificación son: (1) el uso de tintes fluorescentes que se intercalan en el ADN bicatenario, y (2) sondas oligonucleotídicas de ADN modificado que fluorescen cuando se hibridan con un ADN complementario.

60 En el primer método, un tinte de unión al ADN se une a todo el ADN bicatenario (bc) en una PCR, dando como resultado la fluorescencia del tinte. Por tanto, un aumento en el producto de ADN durante la PCR conduce a un aumento en la intensidad de fluorescencia y se mide en cada ciclo, permitiendo cuantificar con ello concentraciones de ADN. La reacción se prepara de modo similar a una reacción de PCR convencional, con la adición del tinte de ADN(bc) fluorescente. La reacción se realiza en un termociclador, y después de cada ciclo se miden los niveles de fluorescencia con un detector; el tinte solo fluoresce cuando se une al ADN(bc) (es decir, el producto de la PCR). Haciendo referencia a una dilución patrón, puede determinarse la concentración de ADN(bc) en la PCR. Al igual que

otros métodos de PCR a tiempo real, los valores obtenidos no tienen unidades absolutas asociadas. Una comparación de la muestra de ADN/ARN medida con una dilución patrón produce una fracción o proporción de la muestra con relación al patrón, lo cual permite realizar comparaciones relativas entre diferentes tejidos o condiciones experimentales. Para asegurar la precisión en la cuantificación, es importante normalizar la expresión de un gen diana a un gen expresado de modo estable. Esto permite la corrección de posibles diferencias en la cantidad o la calidad del ácido nucleico entre muestras.

El segundo método emplea sondas basadas en ARN o ADN específicas de secuencia para cuantificar solo el ADN que contiene la secuencia de sonda; por tanto, el uso de una sonda indicadora aumenta significativamente la especificidad y permite la cuantificación incluso en presencia de una pequeña cantidad de amplificación de ADN no específica. Esto permite el ensayo múltiple, es decir, el ensayo de varios genes en la misma reacción empleando sondas específicas con marcadores con diferentes colores, con la condición de que todos los genes se amplifiquen con eficacia similar.

Este método se realiza habitualmente con una sonda con una base de ADN con un indicador fluorescente (por ejemplo, 6-carboxifluoresceína) en un extremo y un extintor (por ejemplo, 6-carboxitetrametilrodamina) de la fluorescencia en el extremo opuesto de la sonda. La proximidad cercana del indicador al extintor evita la detección de su fluorescencia. La ruptura de la sonda por la actividad exonucleasa 5' a 3' de una polimerasa (por ejemplo, Taq polimerasa) rompe la proximidad del indicador-extintor y, así, permite la emisión no extinguida de fluorescencia, que puede detectarse. Un aumento en el producto en el que se localiza la sonda indicadora en cada ciclo de PCR provoca un aumento proporcional en la fluorescencia debido a la ruptura de la sonda y la liberación del indicador. La reacción se prepara de modo similar a una reacción de PCR convencional, y se añade la sonda indicadora. A medida que comienza la reacción, durante la etapa de asociación de la PCR, tanto la sonda como los cebadores se asocian con el ADN diana. Se inicia la polimerización de una nueva hebra de ADN a partir de los cebadores, y cuando la polimerasa alcanza la sonda, su 5'-3'-exonucleasa degrada la sonda, separando físicamente el indicador fluorescente del extintor, dando como resultado un aumento en la fluorescencia. La fluorescencia se detecta y se mide en un termociclador de PCR a tiempo real, y se emplea el aumento geométrico en la fluorescencia, que se corresponde con un aumento exponencial del producto, para determinar el ciclo umbral en cada reacción.

En ciertas realizaciones, la reacción de QPCR emplea la metodología Taqman™ fluorescente y un instrumento capaz de medir la fluorescencia en tiempo real (por ejemplo, detector de secuencias ABI Prism 7700; véase también PE Biosystems, Foster City, Calif.; véase también Gelfand *et al.* (patente de EEUU n.º 5.210.015), cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). La reacción Taqman™ emplea una sonda de hibridación marcada con dos tintes fluorescentes diferentes. Un tinte es un tinte indicador (6-carboxifluoresceína), y el otro es un tinte extintor (6-carboxitetrametilrodamina). Cuando la sonda está intacta se produce la transferencia de energía fluorescente, y la emisión fluorescente del tinte indicador es absorbida por el tinte extintor. Durante la fase de extensión del ciclo de la PCR, la sonda de hibridación fluorescente se rompe debido a la actividad nucleolítica 5'-3' de la ADN polimerasa. Tras haber roto la sonda, la emisión del tinte indicador ya no se transfiere con eficacia al tinte extintor, lo cual produce un aumento del espectro de emisión fluorescente del tinte indicador.

El ligando de ácido nucleico de la presente invención se cuantifica realizando una QPCR y determinado, de modo directo o indirecto, la cantidad o la concentración del ligando de ácido nucleico que se ha unido a su sonda en la muestra de ensayo. La cantidad o la concentración de la sonda unida en la muestra de ensayo en general es directamente proporcional a la cantidad o la concentración del ligando de ácido nucleico cuantificado empleando una QPCR. Véase, por ejemplo Schneider *et al.*, solicitud de patente de EEUU n.º de publicación 2009/0042206, Dodge *et al.*, patente de EEUU n.º 6.927.024, Gold *et al.*, patentes de EEUU n.º 6.569.620, 6.716.580, y 7.629.151, Cheronis *et al.*, patente de EEUU n.º 7.074.586, y Ahn *et al.*, patente de EEUU n.º 7.642.056, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

La detección de la presencia del aptámero en la muestra analizada se correlaciona directamente con la presencia de la proteína diana en esa muestra. En algunas realizaciones de la invención, la cantidad de aptámero presente en la muestra se correlaciona con la intensidad de la señal después de realizar los métodos basados en PCR. La intensidad de la señal de la PCR depende del número de ciclos de PCR realizados y/o la concentración inicial del aptámero. Puesto que se sabe que la secuencia de la proteína diana genera el aptámero, la detección de este aptámero específico se correlaciona con la presencia de la proteína diana. De modo similar, la detección del ácido nucleico diana amplificado indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra analizada.

En una realización de la invención, durante la amplificación del aptámero o el ácido nucleico diana empleando métodos de PCR convencionales, un método para la detección y la cuantificación del aptámero o ácido nucleico diana amplificados surge de la presencia de una sonda fluorogénica. En una realización de la invención, la sonda, que es específica para el aptámero, tiene un resto 6-carboxifluoresceína (FAM) unido covalentemente al extremo 5', y un tinte de 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) u otro tinte extintor de la fluorescencia (preparado con facilidad empleando una síntesis de ADN automática convencional) presente en el extremo 3', junto con un 3'-fosfato para evitar el alargamiento. La sonda se añade con 5'-nucleasa a los ensayos de PCR, de modo que la ruptura por la 5'-nucleasa del dúplex de sonda-aptámero da como resultado la liberación del resto FAM unido en 5' de la sonda oligonucleotídica. A medida que la amplificación continúa y más aptámero es replicado por las enzimas de PCR o RT-PCR, más FAM es liberado por ciclo y, así, la intensidad de la señal de fluorescencia por ciclo aumenta. El

aumento relativo en la emisión de FAM se controla durante la amplificación con PCR o RT-PCR empleando un termociclador analítico, o un sistema combinado de termociclador/láser/detector/software, tal como un detector de secuencias ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). El instrumento ABI tiene la ventaja de permitir el análisis y la visualización de la cuantificación en menos de 60 s tras la terminación de las reacciones de amplificación. Ambos sistemas de detección emplean un control interno o patrón, en el que una segunda secuencia de aptámero que utiliza los mismos cebadores para la amplificación, pero que tiene una secuencia diferente y por tanto una sonda diferente, se amplifica, se controla y se cuantifica simultáneamente con la de la molécula diana deseada. Véase, por ejemplo, "A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR," Gibson, U. *et al.*, 1996, *Genome Res.*, 6:995-1001; Piatak, M. *et al.*, 1993, *BioTechniques*, 14:70-81; "Comparison of the BI 7700 System (TaqMan) and Competitive PCR for Quantification of IS6110 DNA in Sputum During Treatment of Tuberculosis," Desjardin, L.E. *et al.*, 1998, *J. Clin. Microbiol.*, 36(7):1964-1968), cuyos contenidos se incorporan como referencia en la presente en su totalidad.

En otro método para la detección y la cuantificación de aptámeros durante la amplificación, los cebadores utilizados para la amplificación contienen restos de transferencia de energía molecular (MET), concretamente restos de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), por lo cual los cebadores contienen tanto una molécula donadora como una molécula aceptora. La pareja FRET generalmente contiene un resto donador de fluoróforo, tal como 5-carboxifluoresceína (FAM) o 6-carboxi-4,5-dicloro-2,7-dimetoxifluoresceína (JOE), con un máximo de emisión de 525 o 546 nm, respectivamente, emparejado con un resto aceptor, tal como N'N'N'N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX) o 6-carboxirrodamina (R6G), todos los cuales tienen un máximo de excitación de 514 nm. El cebador puede ser una horquilla, de modo que el extremo 5' del cebador contiene el donador FRET, y el extremo 3' (con apareamiento de bases con el extremo 5' para formar la región del tronco de la horquilla) contiene el aceptor FRET, o extintor. Los dos restos en la pareja de FRET están separados por una longitud de aproximadamente 15-25 nucleótidos cuando el cebador de horquilla se linealiza. Cuando el cebador está en la conformación de horquilla no se detecta fluorescencia. Por tanto, la fluorescencia por el donador solo se detecta cuando el cebador está en una conformación linealizada, es decir, cuando está incorporado en un producto de amplificación bicatenario. Este método permite la cuantificación directa de la cantidad de aptámero unido a la molécula diana en la mezcla de la muestra, y esta cantidad después se emplea para determinar la cantidad de molécula diana originariamente presente en la muestra. Véase, por ejemplo, Nazarenko, I. A. *et al.*, patente de EEUU n.º 5.866.336, cuyo contenido se incorpora como referencia en su totalidad.

En otra realización de la invención, la reacción de QPCR que emplea la metodología TaqMan™ selecciona una sonda TaqMan™ basándose en la secuencia del aptámero que se va a cuantificar e incluye, en general, un extremo 5' con flúor, tal como 6-carboxifluoresceína, por ejemplo, y un extremo 3' con un extintor, tal como, por ejemplo, 6-carboxitetrametilfluoresceína, para generar una señal a medida que la secuencia del aptámero se amplifica con una PCR. A medida que la polimerasa copia la secuencia del aptámero, la actividad exonucleasa libera al flúor de la sonda, que se asocia cadena abajo de los cebadores de PCR, generando con ello una señal. La señal aumenta a medida que se produce el producto replicativo. La cantidad del producto de la PCR depende del número de ciclos replicativos realizados, así como de la concentración inicial del aptámero. En otra realización, la cantidad o la concentración del complejo de afinidad del aptámero (o complejo covalente del aptámero) se determina empleando un tinte fluorescente intercalante durante el proceso replicativo. El tinte intercalante, tal como, por ejemplo, verde SYBR™, genera una gran señal fluorescente en presencia de ADN bicatenario, comparado con la señal fluorescente generada en presencia de ADN monocatenario. A medida que se forma el producto de ADN bicatenario durante la PCR, la señal producida por el tinte aumenta. La magnitud de la señal producida depende del número de ciclos de PCR y de la concentración inicial del aptámero.

Los ácidos nucleicos y las proteínas pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. En general, los ácidos nucleicos pueden extraerse de una muestra biológica mediante una diversidad de técnicas, tales como las descritas en Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 280-281 (1982), cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. En general, las proteínas pueden extraerse de una muestra biológica mediante una diversidad de técnicas, tales como electroforesis bidimensional, enfoque isoeléctrico, y electroforesis en gel de placa de SDS. Véase, por ejemplo, O'Farrell, J. *Biol. Chem.*, 250:4007-4021 (1975), Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), Anderson *et al.*, patente de EEUU n.º 6.391.650, Shepard, patente de EEUU n.º 7.229.789, y Han *et al.*, patente de EEUU n.º 7.488.579, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

En otras realizaciones, se añaden a la muestra anticuerpos con un marcador oligonucleotídico exclusivo para que se unan a una proteína diana, y la detección del marcador oligonucleotídico provoca la detección de proteína. La proteína diana se expone a un anticuerpo que está acoplado con un marcador oligonucleotídico con una secuencia conocida. El anticuerpo se une específicamente a la proteína, y después se emplea una PCR para amplificar el oligonucleótido acoplado al anticuerpo. La identidad de la proteína diana se determina basándose en la secuencia del oligonucleótido unido al anticuerpo y la presencia del oligonucleótido en la muestra. En esta realización de la invención, se emplean diferentes anticuerpos específicos para la proteína diana. Cada anticuerpo está acoplado con un marcador oligonucleotídico exclusivo de secuencia conocida. Por tanto, puede detectarse más de una proteína diana en una muestra identificando el marcador oligonucleotídico exclusivo unido al anticuerpo. Véase, por ejemplo,

Kahvejian, publicación de solicitud de patente de EEUU n.º 2007/0020650, incorporada en la presente como referencia.

En otras realizaciones de la invención, se añaden a la muestra anticuerpos con un marcador nucleotídico exclusivo para que se unan al ácido nucleico diana. Tal como se describió anteriormente, se emplean diferentes anticuerpos específicos para el ácido nucleico diana y, por tanto, puede detectarse más de un ácido nucleico diana en una muestra identificando el marcador oligonucleotídico exclusivo unido. La detección del marcador nucleotídico puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como métodos de PCR, QPCR, marcaje fluorescente, radiomarcaje, biotilación, secuenciación de Sanger, secuenciación mediante síntesis, o secuenciación a tiempo real de una sola molécula. Para una descripción de los métodos de secuenciación de una sola molécula, véase, por ejemplo, Lapidus, patente de EEUU n.º 7.666.593, Quake *et al.*, patente de EEUU n.º 7.501.245, y Lapidus *et al.*, patentes de EEUU n.º 7.169.560 y 7.491.498, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden generarse mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, *Antibodies, A Laboratory Model*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988), cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Además, en el mercado está disponible una amplia variedad de anticuerpos.

El anticuerpo puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, tales como las conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos expresados de modo recombinante, anticuerpos humanizados, planticuerpos y similares; y pueden obtenerse a partir de una diversidad de especies animales, que incluyen conejos, ratones, cabras, ratas, seres humanos, caballos, ganado bovino, cobayas, pollos, ovejas, burros, y similares. En el mercado está disponible una amplia variedad de anticuerpos y pueden obtenerse anticuerpos a medida en una serie de laboratorios contratados. Pueden encontrarse descripciones detalladas de anticuerpos, incluyendo los protocolos pertinentes, entre otros sitios, en *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, eds., John Wiley & Sons (1999, que incluyen las actualizaciones hasta agosto de 2003); *The Electronic Notebook: Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, G. Howard y D. Bethel, eds., CRC Press (2000); J. Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 3ª ed., Academic Press (1996); E. Harlow y D. Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Lab Press (1999); P. Shepherd y C. Dean, *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); A. Johnstone y M. Turner, *Immunochemistry 1 y 2*, Oxford University Press (1997); C. Borrebaeck, *Antibody Engineering*, 2ª ed., Oxford University Press (1995); A. Johnstone y R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Science, Ltd. (1996); H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives (Basics: From Background to Bench)*, Springer Verlag (2000); y S. Hockfield *et al.*, *Selected Methods for Antibody and Nucleic Acid Probes*, Cold Spring Harbor Lab Press (1993).

Los métodos de la invención pueden utilizarse para detectar biomarcadores, tales como los descritos anteriormente. Los ejemplos de biomarcadores preferidos incluyen FGFR3, K-ras, K-ras2, APC, DCC, TP53, PRC1, NUSAP11, CAPZ, PFKP, EVER1, FLT1, ESPL1, AKAP2, CDC45L, RAMP, SYNGR2, NDRG1, ZNF533, y un ácido nucleico hipermetilado.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

Incorporación como referencia

A lo largo de esta descripción se han realizado referencias y citas a otros documentos, tales como patentes, solicitudes de patente, publicaciones de patentes, revistas, libros, artículos, y contenidos web. Todos estos documentos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad para todos los fines.

Equivalentes

La invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o características esenciales. Por tanto, las anteriores realizaciones deben considerarse, en todos los aspectos, ilustrativas y no limitantes de la invención descrita en la presente. Así, el alcance de la invención viene indicado por las reivindicaciones adjuntas y no por la anterior descripción y, por tanto, todos los cambios que estén incluidos en el significado y marco de equivalencia de las reivindicaciones pretenden ser incluidos por estas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para detectar múltiples analitos en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:
obtener una muestra que comprende al menos un ácido nucleico diana y al menos una proteína diana;
introducir un aptámero que se une a la proteína diana en la muestra; y
- 5 realizar un único ensayo, en el que el ensayo detecta el ácido nucleico diana y la proteína diana, comprendiendo dicho ensayo las etapas de:
retirar el aptámero no unido del complejo de aptámero-proteína;
realizar una PCR con el ácido nucleico diana;
realizar una PCR con el aptámero;
- 10 introducir una primera sonda marcada de modo detectable que se une al ácido nucleico diana amplificado;
introducir una segunda sonda marcada de modo detectable que se une al aptámero amplificado;
detectar la primera sonda, detectando con ello el ácido nucleico en la muestra; y
detectar la segunda sonda que está unida al aptámero amplificado, en el que la detección de la segunda sonda detecta la proteína diana.
- 15 2.- El método según la reivindicación 1, que comprende además cuantificar el ácido nucleico diana.
3.- El método según la reivindicación 1, que comprende además cuantificar la proteína diana.
4.- El método según la reivindicación 1, que comprende además cuantificar el ácido nucleico diana y la proteína diana.
5.- El método según la reivindicación 4, en el que la cuantificación comprende:
- 20 realizar una PCR a tiempo real con el ácido nucleico; y
realizar una PCR a tiempo real con el aptámero, en el que la cuantificación del aptámero amplificado cuantifica la proteína diana.
- 6.- El método según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana está asociado con una enfermedad.
7.- El método según la reivindicación 6, en el que la enfermedad es un cáncer.
- 25 8.- El método según la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico diana se selecciona del grupo que consiste en: FGFR3, K-ras, K-ras2, APC, DCC, TP53, PRC1, NUSAP1, CAPZ, PFKP, EVER1, FLT1, ESPL1, AKAP2, CDC45L, RAMP, SYNGR2, NDRG1, ZNF533, y un ácido nucleico hipermetilado.
9.- El método según la reivindicación 1, en el que la proteína diana está asociada con una enfermedad.
10.- El método según la reivindicación 9, en el que la enfermedad es un cáncer.
- 30 11.- El método según la reivindicación 9, en el que la proteína diana se selecciona del grupo que consiste en: MMP-2, MMP-9, complejo de MMP9/NGAL, complejo de MMP/TIMP, complejo de MMP/TIMP1, ADAMTS-7, ADAM-12, timosina 15, timosina 16, profilina, prohibitina, ubiquitina, tropomiosina, Cyr61, cistatina B, y chaperonina 10.