

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 038**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2007 E 07718147 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 1994171**

54 Título: **Análisis multiplexado de muestras de ensayo**

30 Prioridad:

17.01.2006 US 759675 P

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

16.06.2015

73 Titular/es:

**SOMALOGIC, INC. (100.0%)
2945 Wilderness Place
Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

**HEIL, JAMES R.;
SCHNEIDER, DANIEL J.;
NIEUWLANDT, DANIEL T.;
WILCOX, SHERI K.;
ZICHI, DOMINIC;
GANDER, TODD;
EATON, BRUCE y
GOLD, LARRY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 538 038 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

Análisis multiplexado de muestras de ensayo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a métodos, dispositivos, reactivos y kits para la detección de una molécula diana en una muestra y, más concretamente, a la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que puedan estar contenidas en una muestra de ensayo.

10

Antecedentes

La siguiente descripción proporciona un resumen de la información relevante para la presente invención, y no se admite que parte de la información proporcionada o de las publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento sea técnica anterior a la presente invención reivindicada.

15

Los ensayos dirigidos a la detección y cuantificación de moléculas fisiológicamente significativas en muestras biológicas y otras muestras son importantes herramientas en la investigación científica y en el campo de la atención sanitaria. Una clase de dichos ensayos incluye el uso de una micromatriz que incluye uno o más aptámeros inmovilizados sobre un soporte sólido. Todos los aptámeros son capaces de unirse a una molécula diana de una manera muy específica y con muy alta afinidad. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands"; véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.242.246, la patente de Estados Unidos Nº 6.458.543 y la patente de Estados Unidos Nº 6.503.715, todas ellas tituladas "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip". Una vez que la micromatriz se pone en contacto con una muestra, los aptámeros se unen a sus respectivas moléculas diana presentes en la muestra, permitiendo así determinar la ausencia, la presencia, la cantidad y/o la concentración de las moléculas diana en la muestra.

20

25

Una variación de este ensayo emplea aptámeros que incluyen grupos funcionales fotorreactivos que permiten a los aptámeros unirse covalentemente o "fotorreticular" sus moléculas diana. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.544.776 titulada "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip". Estos aptámeros fotorreactivos también se conocen como fotoaptámeros. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.763.177, la patente de Estados Unidos Nº 6.001.577 y la patente de Estados Unidos Nº 6.291.184, todas ellas tituladas "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"; véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands". Una vez puesta en contacto la micromatriz con la muestra y que los fotoaptámeros hayan tenido la oportunidad de unirse a sus moléculas diana, los fotoaptámeros se fotoactivan, y se lava el soporte sólido para eliminar cualquier molécula unida no específicamente. Se pueden usar condiciones duras de lavado, ya que las moléculas diana que se unen a los fotoaptámeros, en general, no se eliminan, debido a los enlaces covalentes efectuados por el/los grupo/s funcional/es fotoactivado/s en los fotoaptámeros. De esta manera, el ensayo permite determinar la ausencia, presencia, cantidad y/o concentración de las moléculas diana en la muestra de ensayo.

30

35

40

En ambos de estos formatos de ensayo, los aptámeros se inmovilizan sobre el soporte sólido antes de ponerlos en contacto con la muestra. En ciertas circunstancias, sin embargo, la inmovilización de los aptámeros antes del contacto con la muestra puede no proporcionar un ensayo óptimo. Por ejemplo, la inmovilización previa de los aptámeros puede producir la mezcla ineficaz de los aptámeros con las moléculas diana sobre la superficie del soporte sólido, conduciendo tal vez a largos tiempos de reacción y, por lo tanto, a períodos de incubación prolongados para permitir la unión eficaz de los aptámeros a sus moléculas diana. Además, cuando se emplean fotoaptámeros en el ensayo, y dependiendo del material utilizado como soporte sólido, el soporte sólido puede tender a dispersar o absorber la luz usada para efectuar la formación de los enlaces covalentes entre los fotoaptámeros y sus moléculas diana. Además, dependiendo del método empleado, la detección de moléculas diana unidas a sus aptámeros puede ser objeto de imprecisión, ya que la superficie del soporte sólido también se puede exponer a y ser afectada por cualquier agente de marcaje que se use. Finalmente, la inmovilización de los aptámeros en el soporte sólido, en general, implica una etapa de preparación del aptámero (es decir, la inmovilización) antes de la exposición de los aptámeros a la muestra, y esta etapa de preparación puede afectar a la actividad o funcionalidad de los aptámeros.

45

50

55

Por consiguiente, existe la necesidad de métodos, dispositivos, reactivos y kits que proporcionen ensayos de alta sensibilidad para la detección y/o la cuantificación de moléculas diana en una muestra de ensayo mediante la optimización de las condiciones que afectan (1) a la actividad de los aptámeros; (2) la eficacia de alcanzar equilibrios de unión para complejos de aptámero-molécula diana; (3) la formación de enlace/s covalente/s entre un aptámero y su molécula diana; y (4) la detección de los complejos de aptámero-molécula diana.

60

El documento US20030219801 se refiere al uso de una molécula de aptámero, diseñada para unirse selectivamente a un ligando, para capturar el ligando específico en una muestra, formando un complejo de aptámero-ligando, y la posterior separación del complejo del resto de la muestra y la amplificación de una subsecuencia del aptámero para identificar el ácido nucleico que ha capturado el ligando mediante el uso de una matriz de ácido nucleico y la

65

identificación del propio ligando.

Kirby *et al.*, 2004 (*Anal. Chem* 76: 4066-4075) describen biosensores de aptámeros inmovilizados en perlas e introducidos en chips micromecanizados en la matriz de sensores de lengua electrónica, y usados para la detección y la cuantificación de proteínas. Kirby explica que los chips de aptámero podrían detectar proteínas en formatos de ensayo tanto de captura como de tipo sándwich.

El documento US2002/0037506 describe un ensayo de tipo sándwich basado en dos aptámeros que reconocen dos sitios independientes en una molécula diana. En particular, el documento US2002/0037506 proporciona un método de detección de la presencia de un compuesto diana en una sustancia que puede contener el compuesto diana que comprende la exposición de una sustancia que puede contener el compuesto diana a una molécula de captura capaz de unirse a dicha molécula diana, estando dicha molécula diana inmovilizada en un soporte sólido.

Baldrich *et al.*, 2004 (*Anal. Chem.* 76: 7053-7063) describe una evaluación sistemática de los parámetros con efecto potencial sobre el rendimiento del ensayo de un aptámero ligado a una enzima (ELAA).

El documento US2005/0142582 describe un protocolo de selección *in vitro* mejorado que se basa en las separaciones magnéticas para la producción de aptámeros de ADN, que es relativamente fácil y escalable sin la necesidad de una robótica costosa. Los aptámeros seleccionados mediante los métodos se usaron en ensayos ligados a una enzima, transferencias Western y purificación por afinidad.

Sekiya *et al* ("In vitro selection of RNA aptamers against cellular and abnormal isoform of mouse prion protein". *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol.49, N° 1, 1 de septiembre de 2005, páginas 361-362) describen un método de aislamiento de aptámeros de proteínas antipríónicas en el que el ARN del competidor está presente durante el período en el que el aptámero y la diana se pueden unir.

Sumario

La presente divulgación incluye métodos, dispositivos, reactivos y kits para la detección y/o la cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo. En una realización, se pone en contacto una muestra de ensayo con un aptámero que incluye un marcador y que tiene una afinidad específica por una molécula diana. Se permite la formación de un complejo de afinidad de aptámero que incluye un aptámero unido a su molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, normalmente, se formará un complejo de afinidad de aptámero en la muestra de ensayo. Opcionalmente, el complejo de afinidad de aptámero se convierte en un complejo covalente de aptámero que incluye un aptámero unido covalentemente a su molécula diana. Entonces, es posible detectar y/o cuantificar el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) usando cualquiera de varios métodos conocidos por un experto en la materia, incluyendo, pero sin limitación, el uso de un soporte sólido, usando espectrometría de masas, y el uso de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR).

En una realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se detecta y/o cuantifica mediante el uso de un soporte sólido. En dicha realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se une a un soporte sólido. La unión se realiza poniendo en contacto el soporte sólido con el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) y permitiendo la asociación de un marcador incluido en el aptámero, ya sea directa o indirectamente, con una sonda que se una al soporte sólido. A continuación, se detecta y, opcionalmente, se cuantifica el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) que se ha asociado con la sonda en el soporte sólido. En cualquier momento antes de la detección y cuantificación opcional, es decir, ya sea en cualquier momento antes de la unión o después de la unión del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) al soporte sólido, el complejo se pone en contacto con un agente de marcaje para permitir la detección de la molécula diana unida.

En otra realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se detecta y/o cuantifica usando espectrometría de masas. En dicha realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se une a un soporte sólido poniendo en contacto el soporte sólido con el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) y permitiendo la asociación de un marcador incluido en el aptámero, ya sea directa o indirectamente, con una sonda que se una al soporte sólido. Esto facilita la división del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) del resto de la muestra de ensayo, concentrando de ese modo la molécula diana antes del análisis de espectrometría de masas y mejorando la detección y la cuantificación de los analitos de mezclas complejas usando esta herramienta analítica. A continuación, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) que se ha asociado con la sonda en el soporte sólido se eluye y se analiza usando espectrometría de masas, lo que produce un espectro de picos que se puede usar para identificar, y por lo tanto, detectar la molécula diana. Una vez que se ha detectado la molécula diana, opcionalmente también se puede detectar mediante técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. En una realización en la que la molécula diana es una proteína, antes de usar la espectrometría de masas para analizar el complejo de aptámero de afinidad (o el complejo covalente de aptámero

opcional), el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) puede ser digerido con enzimas proteasa tales como, por ejemplo, proteinasa K o tripsina, para producir fragmentos de la molécula diana unida que luego se pueden usar para identificar la molécula diana y, por lo tanto, permitir la detección y cuantificación opcional de la molécula diana.

5 En una realización adicional, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se detecta y/o cuantifica usando Q-PCR. En dicha realización, el aptámero libre de la muestra de ensayo se separa del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) antes de la detección y/o cuantificación. El complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se cuantifica
10 mediante la realización de PCR y la determinación, ya sea directa o indirectamente, de la cantidad o concentración de aptámero que se haya unido a su molécula diana en la muestra de ensayo. En general, la cantidad o concentración de la molécula diana en la muestra de ensayo es directamente proporcional a la cantidad o concentración de aptámero cuantificado mediante el uso de Q-PCR. Un método ilustrativo que se puede emplear para cuantificar un complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) de esta manera
15 es el ensayo TaqMan® (PE Biosystems, Foster City, Calif.; véase también la patente de EE.UU. N° 5.210.015).

Breve descripción de las figuras

20 Las Fig. 1A y 1B ilustran métodos ilustrativos para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo.
Las Fig. 2A, 2B y 2C ilustran métodos ilustrativos para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo.
La Fig. 3 ilustra un método ilustrativo para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo.
25 La Fig. 4 muestra curvas de dosis-respuesta para diluciones en serie de VEGF en tampón (Fig. 4A) y plasma (Fig. 4B) usando el ensayo representado en las Fig. 2A, 2B y 2C. La respuesta del tampón sin proteína se ha restado de cada punto de datos en ambos conjuntos. Se muestra el ajuste de la línea de mínimos cuadrados a los datos de registro transformados.
Las Fig. 5A-5J muestran curvas de dosis-respuesta para diluciones en serie de 10 proteínas diana multiplexadas con 41 fotoaptámeros en tampón usando el ensayo representado en las Fig. 2A, 2B y 2C. La respuesta del tampón sin proteína para cada aptámero se ha restado de cada punto de datos en ambos conjuntos. También se representa el ajuste de la línea de mínimos cuadrados a los datos de registro transformados. Solo se muestran los puntos de datos usados en el ajuste lineal.
30 Las Fig. 6A y 6B muestran mediciones repetidas en RFU para la respuesta de 57 fotoaptámeros en muestras de suero para dos individuos obtenidas a partir del ensayo mostrado en las Fig. 2A, 2B y 2C. Ambas mediciones repetidas muestran una reproducibilidad muy buena de las 57 dianas medidas, produciendo correlaciones de Pearson superiores a 0,99.
La Fig. 7 muestra curvas de dosis-respuesta de tPA en tampón (●) y plasma (▲) usando un ensayo de captura de hibridación UPS con el desafío cinético opcional. Se promedió la respuesta del tampón no-proteico, y se restó de ambas curvas. Para la muestra de plasma sin proteína diana añadida, la respuesta del plasma diluido sin desafío cinético se denota con (□) y la de desafío cinético se indica con (Δ) en tPA 0,1 pM. La respuesta medida se reduce en casi un registro debido al desafío cinético en plasma, mientras que la respuesta de diana-aptámero permanece invariables, como se evidencia por (○) (buffer) y (Δ) (plasma) en tPA 10 nM añadido.
40 La Fig. 8 muestra las curvas de dosis-respuesta para tPA en plasma usando el ensayo con el desafío cinético opcional con competidor (■) y sin (●) competidor. El valor de plasma sin proteína se representa a 0,1 pM [tPA] y se reduce en un 70 % debido a la adición del competidor, mientras que la respuesta de la diana-aptámero permanece invariable, como lo demuestran las respuestas en tPA 30 nM, que son esencialmente iguales en presencia o ausencia de competidor.
La Fig. 9 muestra las curvas de dosis-respuesta para tres proteínas diana (tPA (Fig. 9A), PAI-1 (Fig. 9B) e IL-6 (Fig. 9C)) en tampón (●) y plasma (▲). Los valores de RFU se han corregido restando el valor de RFU del tampón sin proteína para cada aptámero. También se representa el ajuste de la línea de mínimos cuadrados a los datos de registro transformados para los datos del tampón. Los valores de RFU del plasma sin proteína corregidos para estos aptámeros (Δ a 1pM) son 66, 26 y 49 RFU, respectivamente.
50 Las Fig. 10A-10D muestran curvas de dosis-respuesta para cuatro proteínas diana reticuladas en tampón y añadidas a plasma antes de la eliminación opcional del aptámero libre usando la precipitación en K⁺/SDS (●) en comparación con las curvas generadas sin la eliminación del aptámero libre (■). La señal se aumenta tras la retirada del aptámero libre y, en general, el rango dinámico de las mediciones aumenta.
La Fig. 11 muestra el efecto de la reticulación química inducida por la luz de una proteína diana (bFGF) a su fotoaptámero cuando se usan detergente y una alta concentración de sal durante la hibridación. En ausencia de luz y, por lo tanto, en ausencia de unión covalente de la diana a su fotoaptámero, la señal de ensayo se reduce más de dos órdenes de magnitud en tampón. La concentración endógena de bFGF es bastante baja, lo que se refleja en la baja señal sobre el control sin luz y la respuesta de fondo general.
60 La Fig. 12 muestra la respuesta a la dosis en tampón de una proteína diana (C4b) usando un fotoaptámero desarrollado con una biblioteca modificada de 5-bencil-dT en lugar de dT. La respuesta lineal en 3 registros de concentración diana demuestra la actividad del aptámero nucleótido modificado en el ensayo.
65

La Fig. 13 muestra la curva de dosis-respuesta generada con el marcaje directo de la proteína diana (▲) o la biotinylation seguida por estreptavidina marcada fluorescente (■) en una superficie Schott Nexterion (Fig. 13A) o una superficie de copolímero de metacrilato de (Fig. 13B). Ambas superficies funcionan bien, y las dos estrategias de marcaje son comparables.

La Fig. 14 ilustra la hibridación de complejos de aptámero-diana bien de tampón (Fig. 14A) o suero al 10 % (Fig. 14B) y marcados con NHS-PEO₄-biotina en una matriz GeneChip[®] Test3 de Affymetrix. La tinción con ficoeritrina-R se realiza en una estación de fluidos GeneChip[®] de Affymetrix. En tampón (Fig. 14A), el aptámero de VEGF se hibrida a la sonda 201 (1) con una intensidad de 3.500 RFU, y el aptámero de bFGF se hibrida a la sonda 1121 (2) con una intensidad de 23.000 RFU. En el suero (Fig. 14B), las intensidades relativas son de 5.000 (1) y 18.000 (2) para los aptámeros de VEGF y bFGF, respectivamente.

La Fig. 15 ilustra el efecto de bloqueo de una matriz GeneChip[®] Test3 de Affymetrix antes de la hibridación de los complejos de aptámero-diana de muestras de plasma. Se hibridaron sondas biotinylation en tampón (Fig. 15A) y en muestras de plasma a las superficies bloqueadas con leche desnatada (Fig. 15B), "bloqueo de arranque" (Fig. 15C) y plasma no marcado (Fig. 15D). Los valores de fondo para estas cuatro superficies son 49, 300, 400 y 500 RFU, mientras que las señales de hibridación para las tres sondas son de 16.000, 33.000 y 18.000 en (Fig. 15A) y (Fig. 15B), 17.000, 35.000 y 18.000 en (Fig. 15C) y 20.000, 36.000 y 18.000 en (Fig. 15D).

La Fig. 16 ilustra la detección cuantitativa de proteínas diana añadidas a plasma, reticuladas a fotoaptámeros e hibridadas en una matriz GeneChip[®] Test3 de Affymetrix. La respuesta de hibridación para los complejos de aptámero de las proteínas diana IL1-R4 (Δ) y bFGF (■) formados en el plasma tiene restado el valor de RFU de la respuesta sin proteína. Se observa un intervalo de cuantificación de dos registros de las muestras de plasma tras bloquear la superficie de la matriz para reducir la adsorción de moléculas en la matriz de la muestra.

La Fig. 17 muestra los valores de respuesta a la dosis de proteínas diana para diluciones en serie de tres proteínas diana multiplexadas con fotoaptámeros en tampón. Las proteínas diana reticuladas a fotoaptámeros fueron capturadas a través de la hibridación a microesferas Luminex SeroMap[™] conjugadas a sondas de oligonucleótidos específicos. Para la cuantificación de la señal, se usó un sistema instrumental Luminex 100 IS. Los valores de IFM (intensidad de fluorescencia media) se han corregido restando el valor de IMF de control sin proteína para cada aptámero.

Descripción detallada

La práctica de la invención desvelada en el presente documento emplea, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante, en el nivel de experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican de manera completa en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Edición actual); "DNA Cloning: A Practical Approach", vol. I & II (D. Glover, ed.); "Oligonucleotide Synthesis" (N. Gait, ed., Edición actual); "Nucleic Acid Hybridization" (B. Hames & S. Higgins, eds., Edición actual); "Transcription and Translation" (B. Hames & S. Higgins, eds., Edición actual).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario, y se usan de forma indistinta con al "al menos uno/a" y "uno/a o más". Por lo tanto, la referencia a "un aptámero" incluye mezclas de aptámeros, la referencia a "una sonda" incluye mezclas de sondas y similares.

Como se usan en el presente documento, los términos y las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene" y cualquier variación de los mismos, pretenden abarcar una inclusión no exclusiva, de modo que un proceso, método, proceso por producto o composición de materia que comprende, incluye o contiene un elemento o una lista de elementos no incluye solo dichos elemento, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, proceso por producto o composición de materia.

La presente divulgación incluye métodos, dispositivos, reactivos y kits para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo. Los métodos, dispositivos, reactivos y kits desvelados proporcionan ensayos de alta sensibilidad para la detección y/o cuantificación de moléculas diana en una muestra de ensayo mediante la optimización de las condiciones que afectan a (1) la actividad de los aptámeros; (2) la eficacia de alcanzar equilibrios de unión para los complejos de aptámero-molécula diana; (3) la formación de enlace/s covalente/s entre un aptámero y su molécula diana; y (4) la detección de complejos de aptámero-molécula diana.

Con referencia a las Fig. 1A y 1B, la presencia de una molécula diana en una muestra de ensayo se detecta y/o cuantifica primero mediante la puesta de contacto de una muestra de ensayo con un aptámero que tiene una afinidad específica por una molécula diana. Se permite la formación de un complejo de afinidad de aptámero que incluye un aptámero unido a su molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, en general, se formará un complejo de afinidad de aptámero en la muestra de ensayo. El complejo de afinidad de aptámero se convierte opcionalmente, usando un método apropiado para el aptámero que se esté empleando, en un complejo covalente de aptámero que incluye un aptámero unido covalentemente a su molécula diana. A continuación, se detecta y/o cuantifica el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional).

En una realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se detecta y/o cuantifica mediante la unión del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) a un soporte sólido. Con referencia a las Fig. 2A, 2B y 2C, en un método ilustrativo para la detección y/o cuantificación de una molécula diana que puede estar presente en una muestra de ensayo, se pone en contacto una muestra de ensayo con un aptámero que incluye un marcador y que tiene una afinidad específica hacia una molécula diana. Se permite la formación de un complejo de afinidad de aptámero que incluye un aptámero unido a su molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, en general, se formará un complejo de afinidad de aptámero en la muestra de ensayo. Opcionalmente, el complejo de afinidad de aptámero se convierte, usando un método apropiado para el aptámero que se esté empleando, en un complejo covalente de aptámero que incluye un aptámero unido covalentemente a su molécula diana. El complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se une a un soporte sólido. La unión se realiza poniendo en contacto el soporte sólido con el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional), y permitiendo que el marcador incluido en el aptámero se asocie, ya sea directa o indirectamente, con una sonda que está unida al soporte sólido. A continuación, se detecta el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) que se ha asociado con la sonda en el soporte sólido y, opcionalmente, se cuantifica. En cualquier momento previo a la detección y la cuantificación opcional, es decir, en cualquier momento antes de la unión o después de la unión del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) al soporte sólido, el complejo se pone en contacto con un agente de marcaje para permitir la detección de la molécula diana unida.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico", "polinucleótido" y "polinucleótido" se usan de forma indistinta para hacer referencia a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud, y dichos nucleótidos pueden incluir desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o análogos, o desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos modificados químicamente. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" incluyen moléculas bi- o monocatenarias, así como moléculas de triple hélice.

Si están presentes, las modificaciones químicas de un nucleótido pueden incluir, por separado o en cualquier combinación, modificaciones del azúcar en posición 2', modificaciones de la pirimidina en posición 5 (por ejemplo, 5-(*N*-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(*N*-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(*N*-[2-(1*H*-indol-3-il)etil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, cloruro de 5-(*N*-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(*N*-naftilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina o 5-(*N*-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina), modificaciones en la purina en posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo- o 5-yodo-uracilo, modificaciones en la estructura, metilaciones, combinaciones inusuales de pares de bases tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como la protección de los extremos. Otras modificaciones pueden incluir la sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos etc.) y aquellas con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos etc.), aquellas con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos etc.), aquellas que contienen alquilantes y aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos α anoméricos etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presente en un azúcar se puede sustituir con un grupo fosfonato o un grupo fosfato; proteger con grupos protectores convencionales; o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH de los extremos 5' y 3' se pueden fosforilar o sustituir con aminas, restos de grupos protectores de extremos orgánicos o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o restos de grupos protectores de extremos orgánicos o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 polímeros de polietilenglicol (PEG) u otros polímeros sintéticos o biológicos hidrófilos o hidrófobos. Si está presente, se puede efectuar una modificación en la estructura nucleotídica antes o después del ensamblaje de un polímero. Se puede interrumpir una secuencia de nucleótidos mediante componentes no nucleotídicos. Se puede modificar más un polinucleótido tras la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente marcador.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcar, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosa o lisosa, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, pseudoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Como se ha indicado anteriormente, se pueden sustituir uno o más enlaces de fosfodiéster con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen realizaciones en las que el fosfato está sustituido con P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (C₁₋₂₀) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces de un polinucleótido tienen que ser idénticos. La sustitución de las formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, como lo pueden ser las estructuras de armazón alternativas como, por ejemplo, una estructura de poliamida.

Como se usa en el presente documento, "aptámero" y "ligando de ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a un ácido nucleico que tiene una afinidad de unión específica por una molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son una cuestión de grado; sin embargo, en el presente contexto, la "afinidad de unión

específica" de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana en general con un grado mucho mayor de afinidad de la que se une a otros componentes de una muestra de ensayo. Un "aptámero" es un conjunto de copias de un tipo o una especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. El término "aptámeros" se refiere a más de uno de dicho conjunto de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. Cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento puede incluir el uso de uno o más aptámeros. Cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento también puede incluir el uso de dos o más aptámeros que se unen específicamente a la misma molécula diana. Como se describe más adelante, un aptámero puede incluir un marcador. Si un aptámero incluye un marcador, no es necesario que todas las copias del aptámero tengan el mismo marcador. Por otra parte, si los diferentes aptámeros incluyen cada uno un marcador, estos aptámeros diferentes pueden tener el mismo marcador o un marcador diferente.

Los aptámeros se pueden identificar usando cualquier método conocido, incluyendo el proceso SELEX. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands". Una vez identificado, el aptámero se puede preparar o sintetizar de acuerdo con cualquier método conocido, incluyendo métodos sintéticos químicos y métodos sintéticos enzimáticos.

El término "SELEX" y la expresión "proceso SELEX" se usan indistintamente en el presente documento para referirse en general a una combinación de (1) la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una molécula diana de una manera deseable, por ejemplo, la unión con alta afinidad a una proteína, con (2) la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands". El proceso SELEX se puede usar para generar un aptámero que se una covalentemente a su diana, así como un aptámero que se une de forma no covalente a su diana. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.705.337 titulada "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX".

Como se desvela en el presente documento, un aptámero puede comprender además un "marcador", que se refiere a un componente que proporciona un medio para unir o inmovilizar un aptámero (y cualquier molécula diana unida al mismo) a un soporte sólido. Un "marcador" es un conjunto de copias de un tipo o una especie de componente que es capaz de asociarse con una sonda. "Marcadores" hace referencia a más de uno de dichos conjuntos de componentes. El marcador se puede unir a o incluir en el aptámero mediante cualquier método conocido en la técnica. En general, el marcador permite que el aptámero se asocie, ya sea directa o indirectamente, con una sonda que está unida al soporte sólido. Un marcador puede permitir la localización de un complejo covalente en una dirección definida espacialmente sobre un soporte sólido. Por lo tanto, diferentes marcadores pueden permitir la localización de diferentes complejos covalentes de aptámero en diferentes direcciones espacialmente definidas sobre un soporte sólido. Un marcador puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, un ligando, un lípido, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores o cualquier otra estructura con la que una sonda (o molécula enlazadora, tal como se describe a continuación) pueda diseñarse configurarse para que se una o se asocie de otro modo con especificidad. En general, un marcador está configurado de manera que no interactúe intramolecularmente consigo mismo o con el aptámero al que está unido o del que forma parte. Si se usa SELEX para identificar un aptámero, el marcador se puede añadir al aptámero antes o después del SELEX. En una realización, el marcador se incluye en el extremo 5' del aptámero después de SELEX. En otra realización, el marcador se incluye en el extremo 3' del aptámero después de SELEX.

En una realización, el marcador incluye un polinucleótido que está diseñado para asociarse directamente con una sonda que incluye una secuencia de polinucleótido complementaria mediante la hibridación directa con la secuencia de la sonda. En dicha realización, el marcador se configura de manera general y la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones tales que el marcador no se hibride con una sonda distinta de la sonda para la que el marcador incluye un complemento perfecto.

En algunas realizaciones, el marcador comprende nucleótidos que forman parte del propio aptámero. Por ejemplo, si se usa SELEX para identificar un aptámero, el aptámero incluye en general un extremo fijo 5' separado de un extremo fijo 3' por una secuencia de nucleótidos que varía, dependiendo del aptámero, es decir, una región variable. En una realización, el marcador puede comprender cualquier número adecuado de nucleótidos incluidos en un extremo fijo del aptámero, tal como, por ejemplo, un extremo fijo entero o cualquier parte de un extremo fijo, incluyendo nucleótidos que son internos a un extremo fijo. En otra realización, el marcador puede comprender cualquier número adecuado de nucleótidos incluidos dentro de la región variable del aptámero, tal como, por ejemplo, toda la región variable o cualquier parte de la región variable. En una realización adicional, el marcador puede comprender cualquier número adecuado de nucleótidos que solapan tanto la región variable como uno de los extremos fijos, es decir, el marcador puede comprender una secuencia de nucleótidos que incluye cualquier parte de (incluyendo toda) la región variable y cualquier parte de (incluyendo todo) un extremo fijo.

En otra realización, un marcador se puede asociar directamente con una sonda y unirse covalentemente a la sonda, de modo que una covalentemente el aptámero a la superficie del soporte sólido. En dicha realización, el marcador y

la sonda pueden incluir grupos reactivos adecuados que, tras la asociación del marcador con la sonda, estén lo suficientemente próximos entre sí para someterse a una reacción química que produzca un enlace covalente. La reacción puede ocurrir espontáneamente o puede requerir la activación, tal como, por ejemplo, la fotoactivación o activación química. En una realización ilustrativa, el marcador incluye un resto dieno y la sonda incluye un dienófilo, y la formación del enlace covalente se produce como consecuencia de una reacción de conjugación espontánea de Diels-Alder del dieno y dienófilo. Se puede usar cualquier química complementaria apropiada tal como, por ejemplo, la reacción de N-Mannich, la formación de disulfuro, la reacción de Curtius, la condensación aldólica, la formación de base de Schiff y la adición de Michael.

En otra realización, el marcador se asocia indirectamente con una sonda, tal como, por ejemplo, a través de una molécula enlazadora, como se describe más adelante. En dicha realización, el marcador puede incluir una secuencia de polinucleótido que sea complementaria a una determinada región o componente de una molécula enlazadora. El marcador se configura de manera general y la reacción de hibridación se lleva a cabo de manera que el marcador no se hibride con una secuencia de polinucleótido distinta de la secuencia de polinucleótido incluida en la molécula enlazadora.

Si el marcador incluye un polinucleótido, el polinucleótido puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. En una realización, un marcador incluye al menos aproximadamente 10 nucleótidos. En otra realización, el marcador incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 nucleótidos. En otra realización más, el marcador incluye al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Diferentes marcadores que incluyen un polinucleótido pueden incluir ya sea el mismo número de nucleótidos o un número diferente de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" representa una modificación o variación irrelevante de los valores numéricos de manera que la función básica del elemento al que el valor numérico se refiere no varía.

Como se usa en el presente documento, "asociado", "asociados" y cualquier variación de los mismos se refiere a una interacción o complejación entre un marcador y una sonda que produce un complejo suficientemente estable con el fin de permitir la separación de los materiales "no asociados" o no unidos, tal como, por ejemplo, los componentes no unidos de una muestra de ensayo, del complejo de marcador-sonda en condiciones de complejación o reacción dadas. Un marcador y una sonda se pueden asociar directamente entre sí mediante la interacción y la unión entre sí con especificidad. Un marcador y una sonda también se pueden asociar entre sí indirectamente de modo que su complejación esté mediada por una molécula enlazadora.

Como se usa en el presente documento, "sonda" se refiere a una molécula que está configurada para asociarse, ya sea directa o indirectamente, con un marcador. Una "sonda" es un conjunto de copias de un tipo de molécula o un tipo de estructura multimolecular que es capaz de inmovilizar un aptámero a un soporte sólido mediante la asociación, ya sea directa o indirectamente, con un marcador. "Sondas" se refiere a más de una de dicho conjunto de moléculas. Una sonda puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, un ligando, un lípido, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores o cualquier otra estructura con la que un marcador (o molécula enlazadora) se puede diseñar o configurar para unirse o asociarse de otra manera con especificidad. Una sonda se puede unir a un soporte sólido, ya sea covalente o no covalentemente, mediante cualquier método conocido en la técnica.

En una realización, la sonda incluye un polinucleótido que tiene una secuencia que es complementaria a una secuencia de marcador de polinucleótido. En dicha realización, la secuencia de sonda se configura de manera general y la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones tales que la sonda no se hibrida con una secuencia de nucleótidos distinta del marcador para el que la sonda incluye la secuencia complementaria (es decir, la sonda se configura de manera general y la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones tales que la sonda no se hibrida con un marcador diferente o un aptámero).

En otra realización, la sonda se asocia indirectamente con un marcador, por ejemplo, a través de una molécula enlazadora. En dicha realización, la sonda puede incluir una secuencia de polinucleótido que sea complementaria a una región o un componente particular de una molécula enlazadora. La sonda se configura de manera general y la reacción de hibridación se lleva a cabo de manera que la sonda no se hibrida con una secuencia de polinucleótido distinta de la secuencia de polinucleótido incluida en la molécula enlazadora.

Si una sonda incluye un polinucleótido, el polinucleótido puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. En una realización, una sonda incluye al menos aproximadamente 10 nucleótidos. En otra realización, una sonda incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 nucleótidos. En otra realización más, una sonda incluye al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Diferentes sondas que incluyen un polinucleótido pueden incluir ya sea el mismo número de nucleótidos o un número diferente de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, "molécula enlazadora" se refiere a una o más moléculas que están configuradas para mediar en la asociación de un marcador con una sonda. En general, la molécula enlazadora es

bifuncional en tanto en cuanto incluye una funcionalidad para la unión a un marcador y una funcionalidad para la unión a una sonda. Una "molécula enlazadora" es un conjunto de copias de un tipo o una especie de molécula/s o estructura/s multimolecular/es que es capaz de asociar un marcador con una sonda. La expresión "moléculas enlazadoras" se refiere a más de una de dicho conjunto de moléculas o estructuras multimoleculares. Una molécula enlazadora puede tener cualquier configuración adecuada, y puede incluir cualquier componente adecuado, incluyendo un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, una molécula de polietilenglicol (PEG), un receptor celular, un ligando, un lípido, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otra estructura o componente químico que se pueda diseñar o configurar para mediar una asociación entre un marcador y una sonda con especificidad. Una molécula enlazadora puede ser alifática o aromática.

La composición de la molécula enlazadora no es relevante para ninguno de los métodos desvelados en el presente documento. A menudo se prefiere que la molécula enlazadora sea hidrófila. Como regla general, la longitud de una determinada molécula enlazadora se puede seleccionar para por conveniencia de la síntesis y facilidad en la mediación de la asociación de un marcador con una sonda. La molécula enlazadora no debe contener funcionalidades, ni ser de una longitud, que vaya a interferir con las reacciones que se desean de acuerdo con los métodos desvelados.

Con referencia a las Fig. 2A, 2B y 2C, cuando se emplea una molécula enlazadora en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la molécula enlazadora se puede introducir en cualquier momento adecuado durante la realización del ensayo y se puede poner primero en contacto con un marcador o una sonda. Por ejemplo, se puede poner en contacto un marcador incluido en un aptámero con la molécula enlazadora cualquier momento previo a que un complejo de aptámero covalente entre en contacto con la sonda sobre un soporte sólido. En otra realización, se puede poner en contacto una sonda unida a un soporte sólido con una molécula enlazadora cualquier momento previo a que la sonda se exponga al marcador en un complejo covalente de aptámero. En una realización adicional, dependiendo de la complejidad del ensayo realizado en particular y de las condiciones de reacción, por ejemplo, se puede poner en contacto una sonda simultáneamente tanto con una molécula enlazadora como con un marcador en un complejo covalente de aptámero.

En general, una molécula enlazadora comprende un componente de asociación del marcador y un componente de asociación de la sonda. El componente de asociación del marcador y el componente de asociación de la sonda se seleccionan de manera independiente basándose en el marcador y en la sonda utilizados en particular en un determinado ensayo. En una realización, el componente de asociación del marcador es un polinucleótido que es complementario a una secuencia de polinucleótido incluida en un marcador. En otra realización, el componente de asociación de la sonda es un polinucleótido que es complementario a una secuencia de polinucleótido incluida en una sonda. En una realización adicional, el componente de asociación del marcador es un polinucleótido y el componente de asociación de la sonda también es un polinucleótido.

En una realización adicional, la molécula enlazadora incluye un componente de asociación del marcador separado de un componente de asociación de la sonda por un tercer componente. En dicha realización, el tercer componente puede incluir una o más moléculas o subcomponentes, incluyendo un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, una molécula alifática de carbono, una molécula de polietilenglicol (PEG), un receptor celular, un ligando, un lípido, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otra estructura química o componente que pueda ayudar en la asociación del marcador con la sonda, tal como, por ejemplo, mediante el aumento de la flexibilidad entre el componente de asociación del marcador y el componente de asociación de la sonda.

Un componente de polinucleótido de una molécula enlazadora puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. En una realización, un componente de polinucleótido de una molécula enlazadora incluye al menos aproximadamente 10 nucleótidos. En otra realización, un componente de polinucleótido de una molécula enlazadora incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 nucleótidos. En otra realización más, un componente de polinucleótido de una molécula enlazadora incluye al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Las moléculas enlazadoras usadas en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento pueden incluir componentes de polinucleótido que tienen bien el mismo número de nucleótidos o un número diferente de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, "fotoaptámero", "ligando de ácido nucleico fotorreactivo" y "aptámero fotorreactivo" se usan indistintamente para hacer referencia a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que se pueden unir de forma covalente o "reticular" con una molécula diana. Por ejemplo, un resto de ácido nucleico de origen natural se puede modificar para que incluya un grupo funcional químico que confiera fotorreactividad al resto de ácido nucleico tras la exposición a una fuente de radiación de una longitud de onda adecuada. Los fotoaptámeros se pueden identificar y/o preparar usando cualquier método conocido. En algunas realizaciones, se identifica un aptámero fotorreactivo usando el proceso fotoSELEX. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.763.177, la patente de Estados Unidos N° 6.001.577 y la patente de Estados Unidos

Nº 6.291.184, toda ellas tituladas "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"; véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands". En otras realizaciones, se prepara un aptámero y se modifica posteriormente para incorporar uno o más grupos funcionales fotorreactivos, generando de este modo un fotoaptámero. En dichas realizaciones, se pueden incorporar uno o más restos de ácidos nucleicos fotorreactivos en un aptámero bien mediante la sustitución de un resto de ácido nucleico fotorreactivo en el lugar de uno o más de otros nucleótidos, tales como uno o más de los nucleótidos timidina y/o citidina en el aptámero, por ejemplo, o mediante la modificación de uno o más restos de ácidos nucleicos para incluir un grupo funcional fotorreactivo.

Los grupos funcionales fotorreactivos ilustrativos que se pueden incorporar a un fotoaptámero incluyen 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 5-bromoviniluracilo, 5-yodoviniluracilo, 5-azidouracilo, 4-tiouracilo, 5-tiouracilo, 4-tiocitosina, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, 5-bromovinilcitosina, 5-yodovinilcitosina, 5-azidocitosina, 8-azidoadenina, 8-bromoadenina, 8-yodoadenina, 8-azidodoguanina, 8-bromoguanina, 8-yodoguanina, 8-azidohipoxantina, 8-bromohipoxantina, 8-yodohipoxantina, 8-azidoxantina, 8-bromoxantina, 8-yodoxantina, 5-[(4-azidofenacil)tio]citosina, 5-[(4-azidofenacil)tio]uracilo, 7-deaza-7-yodoadenina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-bromoadenina y 7-deaza-7-bromoguanina.

Además de estos grupos funcionales fotorreactivos basados en nucleósidos de ejemplo, también se pueden usar otros grupos funcionales fotorreactivos que se pueden añadir a un extremo terminal de un aptámero usando una molécula enlazadora adecuada. Dichos grupos funcionales fotorreactivos incluyen benzofenona, antraquinona, 4-azido-2-nitroanilina, psoraleno, derivados de cualquiera de estos, y similares.

Un grupo funcional fotorreactivo incorporado a un fotoaptámero se puede activar mediante cualquier método adecuado. En una realización, un fotoaptámero que contiene un grupo funcional fotorreactivo se puede reticular con su diana mediante la exposición del complejo de afinidad de fotoaptámero a una fuente de radiación electromagnética. Los tipos adecuados de radiación electromagnética incluyen luz ultravioleta, luz visible, rayos X y rayos γ . Las fuentes de radiación adecuadas incluyen fuentes que utilizan luz monocromática o luz policromática filtrada.

En una realización, un nucleótido fotorreactivo, tal como 4-azido-2-nitro-anilina, por ejemplo, se puede incorporar a un fotoaptámero, y se pueden usar luz que tiene una longitud de onda que varía de aproximadamente 325 nm a aproximadamente 470 nm para irradiar un complejo de afinidad de fotoaptámero que incluye este fotoaptámero. La excitación a estas longitudes de onda se puede lograr, por ejemplo, con diodos emisores de luz (LED) de bajo coste, usando ya sea un solo LED o una matriz de LED, ya que los requisitos de potencia son moderados. Luz casi monocromática que tiene una longitud de onda que varía de 465 a 475 nm, un ángulo de visión de 100 grados y que proporciona 38 lúmenes de luz es suministrada por uno o más LED de alta potencia. En el caso de que un grupo funcional fotorreactivo deseado no se pueda excitar a una longitud de onda producida por un LED, normalmente, se puede usar la sustitución adecuada de grupos aceptores de electrones o donantes de electrones para cambiar moderadamente la longitud de onda de excitación del grupo funcional fotorreactivo con el fin de permitir la excitación del grupo funcional fotorreactivo a una longitud de onda producida por un LED.

En una realización, se incorpora un nucleótido fotorreactivo a un fotoaptámero, y se puede usar luz que tiene una longitud de onda que varía de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 350 nm para irradiar un complejo de afinidad de fotoaptámero que incluya esta fotoaptámero para convertir el complejo de afinidad de fotoaptámero en un complejo covalente de fotoaptámero.

En una realización, un nucleótido fotorreactivo, tal como un 5-yodouracilo o una 5-yodocitosina, por ejemplo, se puede incorporar a un fotoaptámero, y se puede usar luz que tiene una longitud de onda que varía de aproximadamente 320 nm a aproximadamente 325 nm para irradiar un complejo de afinidad de fotoaptámero que incluye dicho fotoaptámero. Esta combinación facilita la fotorreticulación selectiva del fotoaptámero que contiene cromóforo a la molécula diana sin inducir otras fotorreacciones no específicas. Por ejemplo, en el caso de la proteína diana, ningún resto de triptófano que se pudiera incluir en la proteína diana ni ninguna base de timina y uracilo que se pudiera incluir en el fotoaptámero puede ser también fotorreactivo. Dado que el 5-yodouracilo o la 5-yodocitosina absorbe la luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 325 nm, pero el triptófano y las bases de ácidos nucleicos de origen natural no lo hacen, el uso de luz de esta longitud de onda permite una fotorreacción selectiva en el/los 5-yodouracilo/s o la/s 5-yodocitosina/s dentro del complejo de afinidad de fotoaptámero. Se puede suministrar luz monocromática que tiene una longitud de onda que varía de aproximadamente 320 nm a aproximadamente 325 nm, por ejemplo, mediante láser de colorante sintonizable de doble frecuencia emisor de luz a una longitud de onda de aproximadamente 320 nm o mediante un láser de helio y cadmio emisor de luz a una longitud de onda de aproximadamente 325 nm.

En una realización adicional, un complejo de afinidad de fotoaptámero se puede exponer a un láser excimer de cloruro de xenón (XeCl) configurado para emitir luz a una longitud de onda de aproximadamente 308 nm. En dicha realización, el fotoaptámero puede incluir un grupo funcional fotorreactivo (por ejemplo, un 5-bromouracilo o una 5-bromocitosina), y el tratamiento del complejo de afinidad de fotoaptámero con la fuente de luz sirve para fotoactivar

el grupo funcional fotorreactivo de manera que el fotoaptámero se reticula con su molécula diana y se forma un complejo covalente de fotoaptámero.

5 En otra realización más, un fotoaptámero se puede reticular con su diana mediante la exposición de un complejo de afinidad de fotoaptámero a una lámpara de mercurio de alta presión configurada para emitir luz a una longitud de onda de aproximadamente 313 nm. En otras realizaciones, se pueden emplear filtros de longitud de onda para restringir la luz emitida para que sea superior a aproximadamente 300 nm con el fin de reducir al mínimo la activación de cromóforos distintos de los incluidos en un complejo de afinidad de fotoaptámero.

10 En una realización adicional, un fotoaptámero se pueden reticular a su diana mediante la exposición de un complejo de afinidad de fotoaptámero a una lámpara de mercurio de baja presión configurada para emitir luz a una longitud de onda de aproximadamente 254 nm, que luego se absorbe por un fósforo y se vuelve a emitir a una longitud de onda que varía de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 325 nm. En dicha realización, la luz remitida se filtra para eliminar cualquier luz de aproximadamente 254 nm que no sea absorbida por el fósforo, así como cualquier luz de longitudes de onda que varían de aproximadamente 290 nm a aproximadamente 305 nm, que pueda ser perjudicial para una proteína diana.

20 En otra realización más, un grupo funcional fotorreactivo de halógeno, tal como, por ejemplo, un yodouracilo o una bromocitosina se puede incorporar a un fotoaptámero, y un complejo de afinidad de fotoaptámero que incluye este fotoaptámero se puede tratar con luz que tenga una longitud de onda que varíe de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 400 nm. Por ejemplo, se puede usar la luz monocromática del tercer armónico de un láser de neodimio YAG configurado a aproximadamente 355 nm o luz monocromática del primer armónico de un láser excimer de fluoruro de xenón (XeF) a aproximadamente 351 nm.

25 Como se usa en el presente documento, "molécula diana" y "diana" se usan indistintamente para referirse a cualquier molécula de interés a la que un aptámero puede unirse con alta afinidad y especificidad, y que puede estar presente en una muestra de ensayo. Una "molécula de interés" incluye cualquier variación menor de una determinada molécula tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, las variaciones menores de la secuencia de aminoácido, la formación de enlaces disulfuro, la glucosilación, la lipidación, la acetilación, la fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcaje que no altere sustancialmente la identidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un conjunto de copias de un tipo o una especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. La expresión "moléculas diana" o "dianas" se refiere a más de una de dicho conjunto de moléculas. Las moléculas diana ilustrativas incluyen proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, polisacáridos, glucoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, aficuerpos, miméticos de anticuerpos, virus, patógenos, sustancias tóxicas, sustratos, metabolitos, análogos en estado de transición, cofactores, inhibidores, fármacos, colorantes, nutrientes, factores de crecimiento, células, tejidos, y cualquier fragmento o parte de cualquiera de los anteriores. Se pueden identificar aptámeros para prácticamente cualquier molécula química o biológica de cualquier tamaño y, por lo tanto, casi cualquier producto químico o molécula biológica de cualquier tamaño puede ser una diana adecuada. También es posible modificar una diana para mejorar la probabilidad o la fuerza de una interacción entre la diana y el aptámero. En realizaciones ilustrativas, la molécula diana es una proteína. Véase la patente de Estados Unidos Nº 6.376.190 titulada "Modified SELEX Processes Without Purified Protein" para los métodos en los que la diana del SELEX es un péptido.

45 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o artificial; por ejemplo, mediante la formación de puentes disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ser de cadenas sencillas o cadenas asociadas.

55 Como se usan en el presente documento, "molécula no diana" y "no diana" se usan indistintamente para referirse a una molécula contenida en una muestra de ensayo que puede formar un complejo no específico con un aptámero. Una "molécula no diana" o "no diana" es un conjunto de copias de un tipo o una especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. La expresión "moléculas no diana" o "no dianas" se refieren a más de una de dicho conjunto de moléculas. Se apreciará que una molécula que es una no diana para un primer aptámero puede ser una diana para un segundo aptámero. Del mismo modo, una molécula que es una diana para el primer aptámero puede ser una no diana para el segundo aptámero.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo de afinidad de aptámero" se refiere a un complejo no covalente que se forma por la interacción de un aptámero con su molécula diana. Un "complejo de afinidad de aptámero" es un conjunto de copias de un tipo o una especie de complejo formado por un aptámero unido a su correspondiente molécula diana. La expresión "complejos de afinidad de aptámero" se refiere a más de uno de dicho

conjunto de complejos. En general, un complejo de afinidad de aptámero se puede invertir o disociar mediante un cambio en una condición ambiental, por ejemplo, un aumento de la temperatura, un aumento en la concentración de sal o una adición de un desnaturizante.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo covalente de aptámero" se refiere a un complejo de afinidad de aptámero en el que el aptámero ha sido inducido a formar o forma de otro modo un enlace covalente con su molécula diana. Un "complejo covalente de aptámero" es un conjunto de copias de un tipo o una especie de complejo formado por un aptámero unido covalentemente con su correspondiente molécula diana. La expresión "complejos covalentes de aptámero" se refiere a más de uno de dicho conjunto de complejos. Es posible inducir un
10 enlace covalente entre un aptámero y su molécula diana mediante la fotoactivación de un resto químico en el aptámero, incluyendo aquellos restos descritos anteriormente con respecto a los fotoaptámeros. También es posible inducir un enlace covalente entre un aptámero y su molécula diana químicamente. Los grupos químicos que se pueden incluir en un aptámero y usar para inducir un enlace covalente con la diana incluyen, pero sin limitación, aldehídos, maleimidas, derivados de acrililo, derivados de diazonio, tioles, etc. En algunas realizaciones, los grupos
15 químicos de reticulación, tales como las sales de maleimida o diazonio, por ejemplo, pueden convertir los complejos de afinidad de aptámero en complejos covalentes de aptámero simplemente proporcionando el ambiente adecuado y la yuxtaposición de grupos reactivos requeridos para que se produzca la reactividad química específica y suficientemente aumentada. En otras realizaciones, los reticulantes químicos tales como los grupos aldehído pueden requerir la adición de otro componente, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio, para convertir los complejos de
20 afinidad de aptámero en complejos covalentes estables de aptámero, irreversibles. En otras realizaciones más, no se incluyen dichos reticulantes químicos en un aptámero; más bien, se usa un tercer reactivo para convertir un complejo de afinidad de aptámero en un complejo covalente de aptámero facilitando una unión covalente entre el aptámero y su diana. Por ejemplo, un reactivo homo- o heterobifuncional que contiene tanto un resto de amina reactiva (por ejemplo, un *N*-hidroxisuccinimidiléster, un aldehído o un imidato) como un grupo nucleósido reactivo
25 (por ejemplo, una yodoacetamida o un aldehído activado) puede inducir la formación de complejos covalentes de un complejo de afinidad de aptámero tal como un complejo de afinidad formado por un aptámero y una proteína diana.

En el presente documento, la expresión "muestra de ensayo" se refiere a cualquier material, solución o mezcla que contenga una pluralidad de moléculas y pueda incluir al menos una molécula diana. La expresión "muestra de
30 ensayo" incluye muestras biológicas, como se define a continuación, y muestras que se pueden usar para ensayos ambientales o de toxicología, tales como el agua contaminada o potencialmente contaminada y efluentes industriales, por ejemplo. Una muestra de ensayo también puede ser un producto final, un producto intermedio o un subproducto de un proceso de preparación, por ejemplo, un proceso de fabricación. Una muestra de ensayo puede incluir cualquier medio adecuado de ensayo, tampón o diluyente que se haya añadido a un material, una solución o
35 una mezcla obtenida a partir de un organismo o de alguna otra fuente (por ejemplo, el medio ambiente o una fuente industrial).

La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material, solución, o mezcla obtenida a partir de un organismo. Esto incluye sangre (incluyendo sangre entera, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica,
40 plasma y suero), esputo, aliento, orina, semen, saliva, líquido meníngeo, líquido amniótico, líquido glandular, líquido linfático, aspirado de líquido del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, células, un extracto celular y líquido cefalorraquídeo. Esto también incluye fracciones separadas experimentalmente de todo lo anterior. La expresión "muestra biológica" también incluye materiales, soluciones o mezclas que contienen material sólido homogeneizado, tales como procedentes de una muestra de heces, una muestra de tejido o una biopsia de tejido,
45 por ejemplo. La expresión "muestra biológica" también incluye materiales, soluciones o mezclas derivadas de un cultivo de tejido, cultivo celular, cultivo bacteriano o cultivo viral.

La expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier sustrato que tenga una superficie a la que las moléculas se puedan unir, directa o indirectamente, a través de enlaces covalentes o no covalentes. El soporte sólido puede
50 incluir cualquier material de sustrato que sea capaz de proporcionar soporte físico a las sondas que están unidas a la superficie. En general, el material puede soportar condiciones relativas a la unión de las sondas a la superficie y cualquier tratamiento, manipulación o procesamiento posterior encontrado durante la realización de un ensayo. Los materiales pueden ser de origen natural, sintético, o una modificación de un material de origen natural. Los materiales de soporte sólido adecuados pueden incluir silicio, grafito, superficies especulares, laminados, cerámicas,
55 plásticos (incluyendo polímeros tales como, por ejemplo (cloruro de poli(vinilo), copolímeros de cicloolefina, poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon[®]), nylon, poli(butirato de vinilo), germanio, arsenuro de galio, oro, plata etc., usados por sí solos o junto con otros materiales. Se pueden considerar materiales rígidos adicionales, tales como vidrio, incluyendo sílice y además incluyendo, por ejemplo, vidrio que está disponible como Bioglass.
60 Otros materiales que se pueden emplear incluyen materiales porosos tales como, por ejemplo, esferas de vidrio de poro controlado. También se contempla cualquier otro material conocido en la técnica que sea capaz de tener uno o más grupos funcionales, tales como cualquiera de un grupo funcional amino, carboxilo, tiol o hidroxilo, por ejemplo, incorporado en su superficie.

65 El material usado para un soporte sólido puede adoptar cualquiera de varias configuraciones que varían de sencillas a complejas. El soporte sólido puede tener una cualquiera de una serie de formas, incluyendo una tira, placa, disco,

rodillo, partícula, incluyendo esferas, tubos, pocillos y similares. Normalmente, el material es relativamente plano, tal como, por ejemplo, un portaobjetos, aunque puede ser esférico, por ejemplo, una esfera, o cilíndrico (por ejemplo, una columna). En muchas realizaciones, en general, el material tiene forma de un sólido rectangular. Es posible sintetizar múltiples disposiciones predeterminadas tales como, por ejemplo, matrices de sondas, sobre una lámina, que luego se troquelan, es decir, se cortan a lo largo de líneas marcadas en sustratos de matriz individuales. Los ejemplos de soportes sólidos que se pueden usar incluyen pocillos de microtitulación, portaobjetos de microscopio, membranas, perlas paramagnéticas, papel cargado, películas de Langmuir-Blodgett, microplacas de obleas de silicio, microplacas de flujo continuo y micropelotas.

Normalmente, la superficie del soporte sólido es la parte externa del material de sustrato que forma el soporte sólido. La superficie del soporte sólido sobre la que se unen las sondas puede ser lisa o sustancialmente plana, o tener irregularidades tales como depresiones, surcos, elevaciones u otras texturas. La superficie se puede modificar con una o más capas diferentes de compuestos que sirven para modificar las propiedades de la superficie de una manera deseada. En diversas realizaciones, dichas capas de modificación de la superficie, cuando están presente, en general, pueden variar de espesor de un espesor monomolecular a aproximadamente 1 mm, o de un espesor monomolecular a aproximadamente 0,1 mm, o de un espesor monomolecular a aproximadamente 0,001 mm.

Las capas de modificación de la superficie de interés incluyen capas inorgánicas y orgánicas, tales como metales, óxidos metálicos, polímeros, moléculas orgánicas pequeñas, y similares. Las capas poliméricas de interés incluyen copolímeros de metacrilato, poli(acrilamidas, polisacáridos, fosfolípidos, poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietilenaminas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, poliimidas, poliacetatos, y similares, donde los polímeros pueden ser homo- o heteropoliméricos y pueden no tener restos funcionales separados unidos a los mismos (por ejemplo, restos conjugados). Otras modificaciones de la superficie de interés incluyen redes tridimensionales tales como hidrogeles, por ejemplo. Se puede usar cualquier hidrogel adecuado conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/0218130 titulada "Biochips with Surfaces Coated with Polysaccharide-Based Hydrogels", la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20050147994 titulada "Method for Immobilizing a Biologic in a Polyurethane-Hydrogel Composition, a Composition Prepared from the Method, and Biomedical Applications", la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005005908 titulada "Photocrosslinked Hydrogel Blend Surface Coatings", y cualquiera de las referencias citadas en estas publicaciones.

En una realización, la superficie de un soporte sólido incluye un hidrogel. El hidrogel puede comprender, por ejemplo, una matriz de polímero. El hidrogel se puede unir químicamente a la superficie del soporte sólido y puede incluir una funcionalidad de unión que sea capaz de unir, ya sea directa o indirectamente, una sonda al hidrogel. Las funcionalidades de unión ilustrativas incluyen un grupo hidrófobo, un grupo hidrófilo, grupos reactivos tales como aldehídos, epoxi, carbonatos y similares, un carboxilo, un tiol, un sulfonato, un sulfato, un amino, un amino sustituido, un fosfato, un grupo quelante de metales, un tioéter, una biotina, un boronato, etc.

También se puede usar cualquier superficie adecuada para la expresión de genes o el análisis de SNP, incluyendo los sustratos y las superficies ofrecidos, por ejemplo, por Affymetrix, General Electric (por ejemplo, CodeLink), Agilent y Schott Nexterion, ya sea como sustratos y superficies o como componentes de productos que comprenden además otros componentes.

Una sonda se puede unir a la superficie del soporte sólido de cualquier manera adecuada, siempre y cuando la sonda no deje de estar unida durante las etapas de incubación y procesamiento posteriores de acuerdo con los métodos desvelados, tales como el lavado de la superficie para eliminar los complejos no específicos, por ejemplo. La sonda se puede unir estando unida no covalentemente, por ejemplo, adherida, absorbida, adsorbida, o estando unida covalentemente a la superficie del soporte sólido. En el caso de una unión covalente de la sonda al soporte sólido, la superficie del soporte sólido contendrá un grupo funcional que se une a la sonda. La naturaleza del/ de los grupo/s funcional/es usado/s depende de la naturaleza de la sonda. Se ha informado de varios métodos para la unión covalente de moléculas a una superficie. Por lo general, estas reacciones se llevan a cabo mediante la reacción de un grupo funcional activo en una molécula con un grupo funcional activado en la superficie. Como ejemplo, un compuesto que contiene amina se puede unir a un ácido carboxílico que contenga superficie mediante la formación de un éster activado del ácido carboxílico, tal como un derivado de *N*-hidroxisuccinimida. La amina reacciona fácilmente con este éster activado para formar un enlace de amida estable. Esta reacción es útil en condiciones en las que la reacción con la amina deseada es significativamente más rápida que con otros nucleófilos del sistema.

Los ejemplos de métodos que se han descrito previamente en la técnica incluyen la activación de superficies con bromuro de cianógeno, ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, carbonildiimidazol, carbodiimididas, azlactonas, cloruros cianúricos, cloruros de sulfonilo orgánicos, divinilsulfona, ésteres de nitrofenilo, yodoacetilo, maleimida, epoxi, hidrazida, aminación reductora, sales de diazonio y condensaciones de Mannich. Las moléculas que reaccionan con la superficie activada incluyen aminas, alcoholes, ácidos carboxílicos, tioles, carbonilos y compuestos que contienen hidrógenos activos.

En una realización, las sondas se unen a la superficie del soporte sólido en una disposición o un patrón espacial

- predeterminado, lo que significa cualquier disposición en la superficie donde se conocía la identidad de una sonda en una determinada ubicación. En una realización, la disposición predeterminada es una matriz. Una matriz en general incluye cualquier disposición uni-, bi- o tridimensional de las regiones direccionables que llevan una sonda particular asociada con esa región. Una matriz es direccionable en tanto en cuanto tiene múltiples regiones de diferentes sondas, de manera que una región o característica o punto de la matriz en una ubicación o dirección predeterminada en particular de la matriz detecta un determinado complejo covalente de aptámero, y por lo tanto, una determinada molécula diana, en virtud de su asociación específica con el marcador en dicho complejo covalente de aptámero.
- Un conjunto de matrices de la superficie de un soporte sólido se refiere a una o más matrices dispuestas a lo largo de una superficie de un soporte sólido individual, que están separadas por zonas intermatriciales. Normalmente, la superficie del soporte sólido opuesta a la superficie con las matrices (superficie opuesta) no porta ninguna matriz. Las matrices se pueden diseñar para el ensayo de cualquier tipo de muestra de ensayo. La superficie del soporte sólido puede portar al menos una, dos, cuatro, veinte, cien o al menos quinientas matrices. Dependiendo del uso previsto, cualquiera o todas las matrices pueden ser iguales o diferentes entre sí, pudiendo contener cada una múltiples puntos o características de sondas dispuestas sobre las mismas. Una matriz típica puede contener más de diez, más de cien, más de mil o diez mil características, o incluso más de cien mil características, en una zona de menos de aproximadamente 20 cm² o incluso menos que aproximadamente 10 cm². Por ejemplo, las características pueden tener anchuras (es decir, diámetro, para una mancha circular) en el intervalo de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 1,0 cm. En otras realizaciones, cada característica puede tener una anchura en el intervalo de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 1,0 mm, o de aproximadamente 5,0 µm a aproximadamente 500 µm, o de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 200 µm. Las características no circulares pueden tener intervalos de superficies equivalentes a los de las características circulares con los intervalos de anchura anteriores (diámetro).
- Se puede usar cualquiera de varias geometrías de matrices sobre un soporte sólido. Como se ha mencionado anteriormente, un soporte sólido individual puede contener una sola matriz o varias matrices. Las características de la matriz pueden estar dispuestas en filas y columnas rectilíneas. Esto es particularmente atractivo para las matrices individuales de un soporte sólido. Cuando hay varias matrices presentes, dichas matrices pueden estar dispuestas, por ejemplo, en una secuencia de filas curvilíneas por la superficie del soporte sólido (por ejemplo, una secuencia de círculos concéntricos o semicírculos de puntos), y similares. Del mismo modo, el patrón de características puede variar de las filas y columnas rectilíneas de puntos para incluir, por ejemplo, una secuencia de filas curvilíneas por la superficie del soporte sólido (por ejemplo, una secuencia de círculos concéntricos o semicírculos de puntos), y similares. La configuración de las matrices y sus características se puede seleccionar de acuerdo con las consideraciones de fabricación, manipulación y uso.
- Cada característica o elemento de la matriz se define como una región pequeña de forma regular de la superficie del soporte sólido. Las características están dispuestas de una manera predeterminada. Cada característica de una matriz, por lo general, lleva una sonda predeterminada o mezcla de sondas. Cada característica de la matriz molecular puede contener una sonda diferente, y la sonda de una determinada característica puede diferir de las sondas del resto de características de la matriz. Algunas o todas de las características pueden ser de diferentes composiciones. Cada matriz puede contener múltiples puntos o características, y cada matriz puede estar separada de otra matriz por espacios o zonas. También se apreciará que no es necesario que haya ningún espacio que separe las matrices entre sí. Las zonas entre matrices y las zonas entre características normalmente están presentes, pero no son esenciales. Al igual que con todas las zonas fronterizas, estas zonas entre matrices y entre características no llevan ninguna sonda. Se apreciará que las zonas entre matrices y entre características, cuando están presentes, podrían ser de varios tamaños y configuraciones.
- En algunas realizaciones, se puede formar una matriz uniendo una sonda con un primer soporte sólido, tal como una perla, por ejemplo, y luego disponiendo el primer soporte sólido en un formato de matriz sobre un segundo soporte sólido, tal como una placa de microtitulación, por ejemplo. En otras realizaciones, se puede formar una matriz uniendo sondas a perlas direccionables. Las "perlas direccionables" incluyen colorantes, códigos de barras y transpondedores.
- En algunas realizaciones, dependiendo de la superficie del soporte sólido seleccionada, la superficie se puede "bloquear" o "pasivar" con el fin de reducir o inhibir la unión no específica de las moléculas con la superficie del soporte sólido. Los reactivos de bloqueo o pasivación incluyen leche en polvo, caseína, suero combinado, plasma combinado, BSA, PEG-PLL, PEG-silano, SuperBlock o StarterBlock (Pierce Biotechnology, Rockford, Ill.), y cualquier combinación de cualquiera de los anteriores.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de marcaje" se refiere a uno o más reactivos que se pueden usar para detectar una molécula diana que está unida a un aptámero en un complejo covalente de aptámero.
- En una realización para detectar una molécula diana, se pone en contacto un complejo covalente de aptámero con un agente de marcaje que incluye una pareja de unión que sea específica de la molécula diana unida al aptámero. La pareja de unión específica puede ser cualquier resto adecuado, incluyendo un anticuerpo, un fragmento de

anticuerpo, un mimético de anticuerpo sintético, un biomimético, un aptámero, un ligando impreso molecular, y similares. La pareja de unión específica se conjuga o se liga a otro componente de agente de marcaje, por lo general, un resto detectable o un marcador. La unión de la pareja de unión específica con el marcador se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para enlazar una sonda a la superficie del soporte sólido. Se apreciará que, en el caso de la detección de múltiples moléculas diana, se pueden poner en contacto múltiples complejos covalentes de aptámero con una mezcla de pares de unión específicas, siendo cada una específica de una molécula diana sospechosa de estar presente. Los marcadores empleados pueden ser aquellos que son conocidos en la técnica para la detección multiplexada de múltiples moléculas diana.

El resto detectable o marcador se puede detectar directa o indirectamente. En general, cualquier molécula indicadora que sea detectable puede ser un marcador. Los marcadores incluyen, por ejemplo, (i) moléculas indicadoras que se pueden detectar directamente gracias a la generación de una señal; (ii) los miembros de pares de unión específicos que se pueden detectar indirectamente por la unión posterior a un elemento afín que contiene una molécula indicadora; (iii) marcadores de masa detectables mediante espectrometría de masas; (iv) cebadores oligonucleotídicos que pueden proporcionar un molde para la amplificación o ligadura; y (v) una secuencia de polinucleótido o secuencia de reconocimiento específica que pueda actuar como un ligando, tal como, por ejemplo, una proteína represora, en la que en los últimos dos casos, el cebador oligonucleotídico o la proteína represora tendrán, o serán capaces de tener, una molécula indicadora y así sucesivamente. La molécula indicadora puede ser un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, un colorante, una molécula fluorescente, un punto cuántico, una molécula quimioluminiscente, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, una secuencia polinucleotídica amplificable, una partícula tal como una partícula de carbono o de látex, sol metálicos, cristales, liposoma, célula etc., que pueden o no estar marcados adicionalmente con un colorante, un catalizador u otro grupo detectable, un marcador de masas que altere el peso de la molécula a la que está conjugado con fines de espectrometría de masas y similares. El marcador se puede seleccionar entre materiales electromagnéticos o electroquímicos. En una realización, el marcador detectable es un colorante fluorescente. Otros marcadores y esquemas de marcaje serán evidentes para un experto en la materia basándose en la divulgación del presente documento.

En otra realización para detectar una molécula diana, la molécula diana es una proteína, y el complejo covalente de aptámero se pone en contacto con un agente de marcaje que comprende una tinción proteica universal. Como se usa en el presente documento, "tinción proteica universal" y "UPS" se usan indistintamente para referirse a cualquier agente de marcaje que marca la mayoría, si no todas, las proteínas presentes en una muestra de ensayo con un resto detectable, pero tiende a no marcar, o marca solo mínimamente, los ácidos nucleicos u otros componentes del ensayo, tales como el soporte sólido. Cualquier grupo reactivo químico que se encuentra en las proteínas, pero que no se encuentra en los ácidos nucleicos ni en la superficie del sustrato, puede servir como sitio de unión covalente. Los grupos químicos reactivos ilustrativos incluyen aminas primarias (por ejemplo, en restos de lisina), tioles (por ejemplo, en cisteína, que se puede producir mediante la reducción de los enlaces disulfuro), alcoholes (por ejemplo, en restos de serina, treonina, tirosina y azúcar en las glucoproteínas (incluyendo los productos de oxidación del cis-dioles en dichos azúcares)) y carboxilatos (por ejemplo, en ácido glutámico y ácido aspártico).

El resto detectable puede incluir cualquiera de las moléculas indicadoras enumeradas anteriormente y cualquier otra sustancia química o componente que se pueden usar de cualquier manera para generar una señal detectable. El resto detectable se puede detectar a través de una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, o cualquier otra señal detectable que dependa de la identidad del resto. En caso de que el resto detectable sea una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina), la señal se puede generar en presencia del sustrato enzimático y cualquier factor adicional necesario para la actividad enzimática. En caso de que el resto detectable sea un sustrato enzimático, la señal se puede generar en presencia de la enzima y cualquier factor adicional necesario para la actividad enzimática. Las configuraciones de los reactivos adecuadas para unir el resto detectable a una proteína diana incluyen la unión covalente del resto detectable con la proteína diana, la asociación no covalente del resto detectable con otro componente de agente de marcaje que esté unido covalentemente a la proteína diana y la unión covalente del resto detectable a un componente de agente de marcaje que no está asociado covalentemente con la proteína diana. La tinción proteica universal se describe detalladamente en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2006-0057573 A1, presentada el 12 de 2004, titulada "Methods and Reagents for Detecting Target Binding by Nucleic Acid Ligands".

En algunas realizaciones, la UPS es un solo reactivo químico que comprende un resto detectable y reacciona covalentemente con un grupo funcional que es característico de las proteínas, pero no de los aptámeros y, en la reacción, une covalentemente el resto detectable a una proteína diana. Las UPS de acuerdo con dicha realización incluyen colorantes con grupos capaces de reaccionar covalentemente con grupos funcionales que son únicos de las proteínas. Dichos grupos se pueden añadir a los colorantes por derivatización o pueden estar presentes en el colorante no modificado. En una realización, la UPS comprende un colorante activado por *N*-hidroxisuccinimida que reacciona con grupos amina, tal como un fluoróforo activado por *N*-hidroxisuccinimida, incluyendo fluoróforos NHS-Alexa (tales como, por ejemplo, NHS-Alexa 647). Otra UPS que se puede usar es CBQCA (3-(4-carboxibenzoil)quinolin-2-carboxaldehído), que también reacciona con aminas en presencia de cianuro o tioles para formar isoindoles altamente fluorescentes. Otros grupos reactivos de amina adecuados para su uso en reactivos UPS incluyen isocianatos, isotiocianatos, azidas de acilo, cloruros de sulfonilo, aldehídos, ésteres de 4-sulfo-2,3,5,6-

tetrafluorofenol (STP), TFP-Alexa 647 y agentes de arilación tales como cloruro de NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), fluoruro de NBD y diclorotriazinas.

En otras realizaciones, la UPS comprende una pluralidad de reactivos. Por ejemplo, la UPS puede comprender un primer reactivo que reacciona covalentemente con una proteína diana, y uno o más reactivos adicionales que unen el resto detectable, ya sea directa o indirectamente y, bien covalente o no covalentemente, con la proteína diana a través de un grupo químico u otra funcionalidad introducida por el primer reactivo. Cuando la UPS comprende múltiples reactivos, se apreciará que, en algunos casos, los reactivos se añaden secuencialmente y, en otros casos, se pueden añadir simultáneamente.

En una realización, una UPS adecuada comprende (a) un derivado de biotina que reacciona con una proteína diana; y (b) un conjugado de estreptavidina-resto detectable tal como, por ejemplo, un derivado de estreptavidina fluorescente o un conjugado de estreptavidina-enzima. El derivado de biotina reacciona con grupos amina, uniendo así covalentemente la biotina con la proteína diana; el conjugado de estreptavidina-resto detectable se une a los grupos de biotina inmovilizados, localizando así el resto detectable en el/los sitio/s del soporte sólido al/ a los que se une la proteína diana. En dicha realización, los reactivos adecuados incluyen PFP-biotina, NHS-PEO₄-biotina (brazo espaciador de 29 Å), sulfo-NHS-LC-biotina (brazo espaciador de 22,4 Å) y TFP-PEO₃-biotina (brazo espaciador de 32,6 Å).

En otra realización, una UPS adecuada comprende: (a) biotina, o un derivado de biotina, conjugada con un grupo reactivo que es capaz de unir covalentemente la biotina o el derivado de biotina con una proteína diana unida; (b) avidina y/o estreptavidina; y (c) un conjugado de biotina-resto detectable tal como, por ejemplo, un derivado de biotina fluorescente. El derivado de biotina de (a) anterior puede ser un derivado de biotina reactivo con amina, tal como, por ejemplo, NHS-Biotina, en el que la biotina está opcionalmente separada de NHS por átomos espaciadores (Calbiochem, Inc.). La reacción del grupo NHS con aminas primarias en la proteína diana unida conduce a la unión covalente de la biotina con la proteína diana que está unida a su correspondiente aptámero. A continuación, se puede tratar la proteína diana complejada con su correspondiente aptámero con la estreptavidina o la avidina. Dado que la estreptavidina y la avidina se pueden unir cada cuatro biotinas, la adición de estas proteínas proporciona tres sitios de unión de biotina para cada biotina originalmente acoplada a la proteína diana unida por el NHS-biotina. Entonces se puede añadir el derivado de biotina-resto detectable de (c) anterior, tras lo que se une estrechamente a los sitios de unión desocupados de biotina de la estreptavidina o la avidina. En dicha realización, los reactivos adecuados incluyen PFP-biotina, NHS-PEO₄-biotina (brazo espaciador de 29 Å), sulfo-NHS-LC-biotina (brazo espaciador de 22,4 Å) y TEP-PEO₃-biotina (brazo espaciador de 32,6 Å).

Las consideraciones tales como la naturaleza del agente de marcaje, la naturaleza de, y los niveles de corte predeterminados para, las moléculas diana, la importancia biológica de los niveles de diana específicos, etcétera, normalmente, determinan la concentración del agente de marcaje, incluyendo las concentraciones individuales de los reactivos particulares que se pueden usar. La concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determinará empíricamente para optimizar la sensibilidad del método. En una realización, la concentración del agente de marcaje normalmente es suficiente para detectar al menos aproximadamente el 1 % de las moléculas diana. En otra realización, la concentración del agente de marcaje normalmente es suficiente para detectar al menos aproximadamente el 10 % de las moléculas diana. En una realización adicional, la concentración del agente de marcaje normalmente es suficiente para detectar al menos aproximadamente el 90 % de las moléculas diana.

La activación del agente de marcaje depende de la naturaleza de los reactivos usados. Por ejemplo, para aquellos reactivos que se activan con luz, el reactivo se irradia con luz de una longitud de onda apropiada. Los expertos en la materia sugerirán otros métodos de activación en vista de las divulgaciones del presente documento. Para algunos agentes de marcaje, tales como agentes de marcaje que implican un marcador radiactivo, una enzima, etcétera, no se necesita ningún agente de activación. Para los sistemas de enzimas, se puede requerir la adición de un sustrato y/o un cofactor.

El examen del soporte sólido para la presencia y/o cantidad de la señal generada por el agente de marcaje incluye la detección de la señal que, en general, es meramente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, un fluorímetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro, un quimioluminómetro, un actinómetro, un instrumento fotográfico, y similares. La presencia y/o la cantidad de señal detectada se relacionan con la presencia y la cantidad de cualquier molécula diana presente en una muestra de ensayo por encima de un nivel de corte predeterminado. En general, las temperaturas durante las mediciones pueden variar de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. En una metodología, se forman curvas de calibración usando concentraciones conocidas de las moléculas diana que se están ensayando. También se pueden usar calibradores y otros controles.

En una realización, un soporte sólido, incluyendo, por ejemplo, una matriz, se desplaza a un dispositivo de examen donde la superficie del soporte sólido es inspeccionada por la presencia de cualquier molécula diana unida. El dispositivo de examen puede ser un dispositivo de exploración que incluya un sistema óptico. La matriz se puede

examinar o leer, por ejemplo, mediante la iluminación de la matriz, y la lectura de la ubicación y la intensidad de una señal resultante (por ejemplo, fluorescencia) en cada característica de la matriz. El escáner puede ser similar a, por ejemplo, el escáner TECAN LS 300 disponible en Tecan Systems, San José, California. Sin embargo, las matrices se pueden examinar o leer usando métodos o un aparato que no sea el anterior, incluyendo otros métodos de examen de matrices otras técnicas ópticas (por ejemplo, la detección de marcadores quimioluminiscentes o electroluminiscentes) y técnicas eléctricas.

Los resultados generados a partir de un examen de la matriz pueden ser resultados en bruto (tales como lecturas de la intensidad de fluorescencia para cada característica en uno o más canales de colore) o pueden ser resultados procesados, tales como los resultados obtenidos por el rechazo de una lectura para una característica que esté por debajo de un umbral predeterminado y/o la generación de conclusiones basadas en el patrón de lectura de la matriz (por ejemplo, si una determinada molécula diana puede haber estado o no presente en la muestra de ensayo). Los resultados del examen (procesados o no) se pueden desviar (tal como por comunicación) a una ubicación remota, si se desea, y ser recibidos allí para su uso posterior (tales como un procesamiento adicional).

En otra realización, el método se lleva a cabo bajo el control de un ordenador, es decir, con la ayuda de un ordenador. Se puede utilizar, por ejemplo, un ordenador personal compatible IBM[®]. El ordenador funciona con un programa informático específico de los métodos descritos en el presente documento. El soporte físico informático capaz de ayudar en la realización de los métodos desvelados en el presente documento puede incluir un sistema que tiene las siguientes especificaciones: procesador Pentium[®] o mejor con una velocidad del reloj de al menos 100 MHz, al menos 32 megabytes de memoria de acceso aleatorio (RAM) y al menos 80 megabytes de memoria virtual, que funciona con el sistema operativo Microsoft Windows[®] 95 o con Microsoft Windows NT[®] 4.0 (o sucesor del mismo), por ejemplo.

El soporte lógico que se puede usar para llevar a cabo los métodos puede ser, por ejemplo, Microsoft Excel o Microsoft Access[®], ampliado de manera adecuada a través de funciones escritas por el usuario y plantillas, y conectado, cuando sea necesario, con los programas independientes que se puedan desear. Los ejemplos de soporte lógico o programas informáticos usados en la asistencia de la realización de los presentes métodos pueden estar escritos en Visual BASIC[®], FORTRAN, C, C++, Java, Python o cualquier otro lenguaje de programación adecuado disponible actualmente o en el futuro. Se ha de entender que la anterior información informática y el soporte lógico usados en el presente documento son meramente ilustrativos, y no pretenden ser restrictivos. Cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento se puede adaptar a otros ordenadores, sistemas informáticos y soporte lógico. Otros lenguajes que se pueden usar incluyen, por ejemplo, PASCAL, PERL o lenguaje ensamblador.

En otra realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se detecta y/o cuantifica usando espectrometría de masas. Con referencia a la Fig. 1B, en un método ilustrativo para la detección y/o cuantificación de una molécula diana que puede estar presente en una muestra de ensayo, se pone en contacto una muestra de ensayo con un aptámero que incluye un marcador y tiene una afinidad específica por una molécula diana. Se permite la formación de un complejo de afinidad de aptámero que incluye un aptámero unido a su molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, en general, se formará un complejo de afinidad de aptámero en la muestra de ensayo. El complejo de afinidad de aptámero se convierte opcionalmente, usando un método apropiado para el aptámero que se esté empleando, en un complejo covalente de aptámero que incluye un aptámero unido covalentemente a su molécula diana. El complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se une a un soporte sólido. La fijación se lleva a cabo poniendo en contacto el soporte sólido con el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) y permitiendo que el marcador incluido en el aptámero se asocie, ya sea directa o indirectamente, con una sonda unida al soporte sólido. El complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) que se ha asociado con la sonda en el soporte sólido se prepara entonces para la detección (y cuantificación opcional) usando espectrometría de masas.

El complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se puede preparar para la detección y cuantificación opcional mediante espectrometría de masas usando cualquiera de varios métodos. Por ejemplo, en una realización, cuando la molécula diana es una proteína, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se prepara por digestión de la proteasa ya sea antes o después de retirar el complejo del soporte sólido. En otra realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se libera del soporte sólido y después se prepara para el análisis de espectrometría de masas usando cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica, incluyendo la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), la ionización por desorción láser de superficie mejorada (SELDI), la ionización por electronebulización o la ionización por impacto de electrones. En una realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se puede eluir directamente en un espectrómetro de masas de ionización por electronebulización. En otras realizaciones, la muestra de ensayo eluida se puede someter a un procesamiento adicional, tal como, por ejemplo, la digestión enzimática o modificación química, antes del análisis de espectrometría de masas. Los espectros de masas se pueden obtener mediante, por ejemplo, ionización por electronebulización, ionización por desorción láser asistida por matriz o ionización por impacto electrónico.

Por lo general, la cuantificación de una molécula diana mediante espectrometría de masas requiere un patrón

interno, es decir, un compuesto de concentración conocida que se introduce en la muestra de ensayo que se va a analizar. Los patrones internos ideales tendrán características de elución y de ionización similares a las de la molécula diana, pero generarán iones con diferentes proporciones de masa-carga. Un patrón interno común es una versión marcada con isótopo estable de la molécula diana. En una realización, como patrón interno, se añade una versión marcada con isótopo estable de la molécula diana a la muestra de ensayo. A continuación, se comparan los picos espectrales correspondientes a los diversos componentes de la muestra de ensayo con la altura o superficie del pico del patrón interno, permitiéndose así la cuantificación de la molécula diana.

En otra realización, la cuantificación de la molécula diana se lleva a cabo mediante la comparación de la altura del pico o de la superficie de los picos espectrales correspondientes a la molécula diana con aquellos picos espectrales generados a partir de un conjunto de muestras con concentraciones conocidas de la molécula diana. Las alturas de los picos o las superficies de los picos espectrales obtenidas de las muestras que tienen concentraciones conocidas de la molécula diana constituyen una curva patrón a partir de la cual se puede calcular la concentración desconocida de la molécula diana en la muestra de ensayo.

En otra realización, el complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se detecta y/o cuantifica usando Q-PCR. Como se usa en el presente documento, "Q-PCR" se refiere a una reacción de PCR realizada de manera y en condiciones controladas que los resultados del ensayo son cuantitativos, es decir, el ensayo es capaz de cuantificar la cantidad o la concentración de aptámero presente en la muestra de ensayo. Con referencia a la Fig. 1B, en un método ilustrativo para la detección y/o cuantificación de una molécula diana que puede estar presente en una muestra de ensayo, se pone en contacto una muestra de ensayo con un aptámero que puede incluir un marcador y tiene una afinidad específica por una molécula diana. Se permite la formación de un complejo de afinidad de aptámero que incluye un aptámero unido a su molécula diana. En general, si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, se formará un complejo de afinidad de aptámero en la muestra de ensayo. El complejo de afinidad de aptámero se convierte opcionalmente, usando un método apropiado para el aptámero que se esté empleando, en un complejo covalente de aptámero que incluye un aptámero unido covalentemente a su molécula diana. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad de aptámero y cualquier conversión opcional a un complejo covalente de aptámero, cualquier aptámero libre que pueda estar presente en la muestra de ensayo se separa después del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional). El complejo de afinidad de aptámero (u complejo covalente de aptámero opcional) se cuantifica después usando técnicas conocidas para la replicación cuantitativa de polinucleótidos.

En una realización, la cantidad o la concentración del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) en la muestra de ensayo se determina usando PCR TaqMan[®]. Esta técnica, en general, se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la enzima oligonucleotídica en replicación para generar una señal a partir de una secuencia diana. La sonda TaqMan se selecciona basándose en la secuencia del aptámero que se va a cuantificar y, en general, incluye un flúor de extremo 5', tal como 6-carboxifluoresceína, por ejemplo, y un inactivador de extremo 3' tal como, por ejemplo, una 6-carboxitetrametilfluoresceína, para generar la señal a medida que la secuencia de aptámero se amplifica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como las copias de polimerasa de la secuencia de aptámero, la actividad exonucleasa libera el flúor de la sonda, que se hibrida corriente abajo de los cebadores de PCR, generando de esta manera la señal. Se producen los aumentos de señal como producto replicado. La cantidad de producto de PCR depende tanto del número de ciclos de duplicación realizados, como de la concentración de partida del aptámero.

En otra realización, la cantidad o concentración de un complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se determina usando un colorante fluorescente de intercalación durante el proceso de replicación. El colorante de intercalación, tal como, por ejemplo, SYBR[®] verde, genera una potente señal fluorescente en presencia de ADN de doble cadena en comparación con la señal fluorescente generada en presencia de ADN monocatenario. A medida que se forma el producto de doble cadena de ADN durante la PCR, la señal producida por el colorante aumenta. La magnitud de la señal producida depende tanto del número de ciclos de PCR como de la concentración de partida del aptámero.

En otra realización, la cantidad o la concentración del complejo de afinidad de aptámero (o complejo covalente de aptámero opcional) se determina usando una "baliza molecular" durante el proceso de replicación (véase, por ejemplo, Tyagi *et al*, *Nat. Biotech.* 16:49 53, 1998; patente de EE.UU. N^o 5.925.517). Una baliza molecular es una sonda de ácido nucleico específica que se pliega en un bucle de horquilla y contiene un flúor en un extremo y un inactivador en el otro extremo de la estructura de horquilla, de manera que poca o ninguna señal es generada por el flúor cuando se forma la horquilla. La secuencia del bucle es específica de una secuencia de polinucleótido diana y, al hibridarse con la secuencia de aptámero, la horquilla se despliega y, de ese modo, genera una señal fluorescente.

Se puede utilizar un programa informático para llevar a cabo una o más etapas de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento. Otro aspecto de la presente divulgación es un producto de programa informático que comprende un medio de almacenamiento legible por ordenador que tiene un programa informático almacenado en el mismo que, cuando se carga en un ordenador, realiza o colabora en la realización de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.

Un aspecto de la divulgación es un producto de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, en

concreto, un resultado del ensayo, que se puede evaluar en el sitio del ensayo o se puede enviar a otro sitio para la evaluación y la comunicación a una parte interesada en una ubicación remota, si se desea. Como se usa en el presente documento, "ubicación remota" se refiere a una ubicación que es físicamente diferente de aquella en la que se obtienen los resultados. Por consiguiente, los resultados se pueden enviar a una sala diferente, un edificio
5 diferente, una parte diferente de la ciudad, una ciudad diferente, etcétera. Los datos pueden ser transmitidos por medios convencionales tales como, por ejemplo, fax, correo, entrega al día siguiente, correo electrónico, ftp, correo de voz, y similares.

"Comunicar" la información se refiere a la transmisión de los datos que representan esa información como señales eléctricas por un canal de comunicación adecuado (por ejemplo, una red privada o pública). "Desviar" un artículo se refiere a cualquier medio de conseguir que el artículo vaya de un lugar a otro, ya sea por transporte físico de ese elemento o de otra manera (si eso es posible) e incluye, al menos en el caso de los datos, el transporte físico de un medio que porta los datos o la comunicación de los datos.
10

En relación con la Fig. 3, en otro método ilustrativo para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo, una muestra de ensayo que puede comprender una molécula diana y al menos una molécula no diana se puede poner en contacto opcionalmente con una molécula competidora (indicada como Opción A en la Fig. 3). Se pueden formar uno o más complejos no específicos. La muestra de ensayo se pone en contacto con un aptámero que incluye un marcador y tiene afinidad específica por
15 una molécula diana. Se permite la formación de un complejo de afinidad de aptámero que comprende un aptámero unido a su molécula diana. En general, si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, se formará un complejo de afinidad de aptámero en la muestra de ensayo. Dependiendo de la naturaleza de la muestra de ensayo, también se pueden formar uno o más complejos inespecíficos entre el aptámero y una o más moléculas no diana. Si la muestra de ensayo se ha puesto en contacto con una molécula competidora, también se pueden haber formado
20 diversos complejos no específicos que comprenden el competidor y estar presentes en la muestra de ensayo.
25

Opcionalmente, luego se puede exponer la muestra de ensayo a condiciones que desafían cinéticamente los componentes de la muestra de ensayo (indicado como la Opción B en la Fig. 3). Como se describe más adelante, un desafío cinético puede comprender la dilución de la muestra de ensayo, la introducción de una molécula competidora en la muestra de ensayo o la captura de los complejos de afinidad de aptámero sobre un soporte sólido seguida por el lavado, ya sea con o sin moléculas competidoras presentes en la solución de lavado. Si se introduce un desafío cinético, es poco probable que, tras la disociación, se vuelvan a formar complejos no específicos entre el aptámero y cualquier molécula no diana. Dado que los complejos no específicos, en general, se disocian más rápidamente que un complejo de afinidad de aptámero, un desafío cinético reduce la probabilidad de que un aptámero esté incluido en un complejo no específico con una no diana. Un desafío cinético eficaz puede proporcionar el ensayo con especificidad adicional, además de la unión del aptámero inicial y la posterior interacción covalente.
30
35

Independientemente de si se emplea un desafío cinético, el complejo de afinidad de aptámero que se ha formado se convierte después, usando un método apropiado para el aptámero que se esté empleando, en un complejo covalente de aptámero que comprende un aptámero unido covalentemente a su molécula diana. Tras la formación del complejo covalente de aptámero, se puede separar de la muestra de ensayo opcionalmente cualquier aptámero libre o no complejo que pueda estar presente en la muestra de ensayo (indicado como Opción C en la Fig. 3). Opcionalmente, se puede separar de la muestra de ensayo cualquier molécula libre o no diana y diana no complejada que pueda estar presente en la muestra de ensayo (indicado como Opción D en la Fig. 3). Opcionalmente, tanto EL aptámero libre como las moléculas no diana y diana libres se pueden retirar, en cualquier orden, tras la formación del complejo covalente de aptámero.
40
45

Si se usa dilución para introducir un desafío cinético, preferentemente, la posterior muestra de ensayo que contiene el complejo covalente de aptámero se concentra. Si procede, esta concentración se puede realizar usando métodos descritos a continuación con respecto a la separación opcional de cualquier aptámero libres de la muestra de ensayo y/o la eliminación opcional de otros componentes de la muestra de ensayo que puedan reaccionar con el agente de marcaje.
50

Entonces, el complejo covalente de aptámero de la muestra de ensayo se detecta y/o cuantifica usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento o cualquier otro método adecuado conocido por un experto habitual en la materia. Por ejemplo, el complejo covalente de aptámero se puede unir a una superficie de un soporte sólido poniendo en contacto el soporte sólido con la muestra de ensayo y permitiendo la asociación de un marcador en el aptámero, ya sea directa o indirectamente, con una sonda que está inmovilizada en la superficie del soporte sólido. Entonces, el complejo covalente de aptámero que se ha asociado con la sonda en el soporte sólido se detecta y, opcionalmente, se cuantifica. En cualquier momento previo a la detección y la cuantificación opcional, es decir, ya sea en cualquier momento previo a la fijación o posterior a la unión del complejo covalente de aptámero con el soporte sólido, el complejo covalente de aptámero se pone en contacto con un agente de marcaje para permitir la detección de la molécula diana unida. Como el experto habitual en la materia apreciará, el complejo covalente de aptámero también se puede detectar y/o cuantificar usando espectrometría de masas, Q-PCR o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica.
55
60
65

Como se usa en el presente documento, "molécula competidora" y "competidor" se usan indistintamente para hacer referencia a cualquier molécula que puede formar un complejo inespecífico con una molécula no diana. Una "molécula competidora" o "competidor" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula. "Moléculas competidoras" o "competidores" hacen referencia a más de una de dicho conjunto de moléculas. Las moléculas competidoras incluyen oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN de esperma de salmón monocatenario y polidextranos (por ejemplo, sulfato de dextrano)), polímeros de fosfodiéster abásicos, dNTP y pirofosfato. En el caso de un desafío cinético que usa un competidor, el competidor también puede ser cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con un aptámero. Dichas moléculas competidoras incluyen policationes (por ejemplo, espermina, espermidina, polilisina y poliarginina) y aminoácidos (por ejemplo, arginina y lisina).

Como se usa en el presente documento, "complejo no específico" hace referencia a una asociación no covalente entre dos o más moléculas distintas a un aptámero y su molécula diana. Dado que un complejo no específico no se selecciona basándose en una interacción de afinidad entre sus moléculas constituyentes, sino que representa una interacción entre clases de moléculas, las moléculas asociadas en un complejo no específico presentarán, como media, afinidades mucho más bajas entre sí y tendrán una velocidad de disociación correspondientemente más elevada que un aptámero y su molécula diana. Los complejos no específicos incluyen complejos formados entre un aptámero y una molécula no diana, un competidor y una molécula no diana, un competidor y una molécula diana, y una molécula diana y una molécula no diana.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "desafiar cinéticamente" y "desafío cinético" se refieren a un proceso de enriquecimiento en un complejo de afinidad de aptámero de un conjunto de complejos que incluye un complejo de afinidad de aptámero y complejos no específicos, mediante la aplicación de presión cinética y haciendo uso de las diferentes características de afinidad de los constituyentes de dichas clases de complejos, incluyendo las velocidades de disociación. En general, un desafío cinético produce un aumento de la especificidad, ya que los complejos de aptámero-no diana normalmente se reducen en comparación con los complejos de aptámero-diana. Como se usa en el presente documento, la expresión "presión cinética" se refiere a un medio para proporcionar una oportunidad para la disociación natural de complejos y/o inhibir la reunión de moléculas que se disocian de un complejo de manera natural. La presión cinética se puede aplicar mediante la adición de una molécula competidora, o mediante la dilución de la muestra, o mediante extensos lavados cuando los complejos están unidos a un soporte sólido, o mediante cualquier otro medio conocido por un experto en la materia. Como el experto habitual en la materia apreciará, debido a que un desafío cinético, en general, depende de las velocidades de disociación diferentes de los complejos de afinidad de aptámero y los complejos de aptámero-no diana, la duración del desafío cinético se selecciona para conservar una alta proporción de complejos de afinidad de aptámero, reduciendo a la vez sustancialmente el número de complejos de aptámero-no diana. Para que un desafío cinético sea eficaz, preferentemente, la velocidad de disociación para el complejo de afinidad de aptámero es significativamente inferior a la de los complejos de aptámero-no diana. Dado que se puede seleccionar un aptámero para que incluya determinadas propiedades, los componentes de un complejo de afinidad de aptámero se pueden diseñar para tener una velocidad de disociación relativamente baja.

Como se usa en el presente documento, el término "división" se refiere a una separación o eliminación de una o más especies moleculares de la muestra de ensayo. La división se puede usar para aumentar la sensibilidad y/o reducir el fondo. La división es más eficaz tras la formación del complejo covalente de aptámero, cuando el complejo de afinidad de aptámero se vuelva irreversible debido a los enlaces covalentes.

Por ejemplo, la eliminación del aptámero libre de la muestra de ensayo puede aumentar la sensibilidad del ensayo, ya que el aptámero libre puede competir con un complejo covalente de aptámero durante la unión del complejo covalente de aptámero a una sonda en la superficie del soporte sólido. Cuando se usa Q-PCR para la detección y cuantificación opcional, la eliminación del aptámero libre facilita la detección y cuantificación de la molécula diana. En una realización, la molécula diana es una proteína y el aptámero libre se separa del complejo covalente de aptámero (y del resto de la muestra de ensayo) mediante el uso de reactivos que precipitan las proteínas y los complejos que incluyen proteínas, tales como el complejo covalente de aptámero, y no los ácidos nucleicos libres de la muestra de ensayo. Dichos reactivos pueden incluir K^+ /SDS, acetona, $(NH_4)_2SO_4$, ProCipitate y otros polímeros cargados que son conocidos en la técnica.

En una realización, un aptámero tal como, por ejemplo, un fotoaptámero marcado con una afinidad específica por una molécula diana, en este caso una proteína diana, se introduce en la muestra de ensayo. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad de aptámero y la conversión en un complejo covalente de aptámero, el complejo covalente de aptámero-proteína y la proteína no complejada se precipitan en la muestra de ensayo usando un reactivo apropiado, tal como cualquiera de los reactivos enumerados anteriormente o cualquier otro reactivo adecuado. Los componentes precipitados de la muestra de ensayo se sedimentan por centrifugación y se desecha el sobrenadante que contiene aptámero libre. A continuación, se suspende el sedimento, que contiene proteína libre y el complejo covalente de aptámero-proteína, en una solución apropiada tal como, por ejemplo, el diluyente de unión del ensayo, y entonces, se puede poner en contacto el complejo covalente de aptámero con un agente de marcaje, ya sea antes o después de la unión del complejo

covalente de aptámero al soporte sólido. Entonces, la molécula diana, si está presente en la muestra de ensayo, se detecta y/o cuantifica mediante la detección del agente de marcaje en el complejo covalente de aptámero.

5 Para reducir el fondo del ensayo, se pueden eliminar de la muestra de ensayo las moléculas que pueden reaccionar con el agente de marcaje y que no están unidas covalentemente con el aptámero. En una realización, esto se realiza por precipitación del aptámero, tanto libre como complejado, en la muestra de ensayo, dejando otras moléculas que pueden reaccionar con el agente de marcaje en el sobrenadante para su retirada. Dicha precipitación de ácido nucleico se puede realizar con reactivos que incluyen bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) y disolventes orgánicos tales como etanol, por ejemplo. En otra realización, el aptámero, tanto libre como complejado, se separa de la muestra por hibridación del aptámero en un soporte sólido. En este caso, el soporte sólido puede incluir microperlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas), cualquier otro soporte sólido adecuado descrito en el presente documento, y similares. Tras dejar que el aptámero se hibride con la superficie de un soporte sólido adecuado, la solución que contiene moléculas que pueden reaccionar con el agente de marcaje se elimina fácilmente, produciendo una concentración del complejo covalente de aptámero. Como cualquier experto habitual en la materia apreciará, la separación del aptámero de esta manera puede usar bien un marcador incluido en el aptámero o alguna otra secuencia de ácido nucleico del aptámero para hibridar el aptámero a una secuencia de nucleótidos complementaria adecuadamente unida al soporte sólido.

20 En una realización, un aptámero de marcaje, tal como un fotoaptámero marcado con una afinidad específica por una proteína diana, se introduce en la muestra de ensayo. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad de aptámero y la conversión en un complejo covalente de aptámero, el complejo covalente de aptámero-proteína y el aptámero libre se precipitan en la muestra de ensayo usando un reactivo apropiado tal como cualquiera de los reactivos mencionados anteriormente o cualquier otro reactivo adecuado. Los componentes precipitados de la muestra de ensayo se sedimentan por centrifugación, y se desecha el sobrenadante que contiene diana no complejada y el resto de la muestra de ensayo. Luego, se suspende el sedimento, que contiene el aptámero libre y el complejo covalente de aptámero, en una solución apropiada tal como, por ejemplo, el diluyente de unión del ensayo, y entonces se pueden poner en contacto el complejo covalente de aptámero y el aptámero libre con un agente de marcaje, ya sea antes o después de la unión del complejo covalente de aptámero con el soporte sólido. Entonces, se detecta y/o cuantifica la molécula diana, si está presente en la muestra de ensayo, mediante la detección del agente de marcaje en el complejo covalente de aptámero.

35 En otra realización, un aptámero marcado, tal como un fotoaptámero marcado con una afinidad específica por una proteína diana, se introduce en la muestra de ensayo. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad de aptámero y la conversión en un complejo covalente de aptámero, el complejo covalente de aptámero-proteína y el aptámero libre son capturados sobre un soporte sólido usando, por ejemplo, perlas que contienen una sonda que es complementaria al marcador de aptámero. Las perlas se sedimentan por la fuerza magnética, en el caso de las perlas paramagnéticas, o por centrifugación para las perlas no paramagnéticas, y se desecha el sobrenadante que contiene diana no complejada y muestra de ensayo. Entonces, se suspende el sedimento en una solución apropiada tal como, por ejemplo, el diluyente de unión del ensayo, y el complejo covalente de aptámero y el aptámero libre se eluyen usando cualquier medio adecuado para interrumpir la interacción de hibridación, incluyendo, por ejemplo, calor, pH alto, agua destilada, alguna combinación de estos o cualquier otro método conocido. Se vuelven a sedimentar las perlas, y el sobrenadante, que contiene el aptámero libre y el complejo covalente de aptámero, se puede poner en contacto con un agente de marcaje, ya sea antes o después de la unión del complejo covalente de aptámero con el soporte sólido. Entonces se detecta y/o cuantifica la molécula diana, si está presente en la muestra de ensayo, mediante la detección del agente de marcaje en el complejo covalente de aptámero.

50 En otra realización, el ensayo se realiza como se ha descrito anteriormente, hasta e incluyendo la etapa en la que se suspenden las perlas tras desechar el sobrenadante que contiene diana no complejada y muestra de ensayo. Entonces, antes de eluir el aptámero libre y el complejo covalente de aptámero de las perlas, el complejo covalente de aptámero se puede poner en contacto con un agente de marcaje, seguido de la aglomeración repetida y el lavado para eliminar el agente de marcaje no reactivo antes de poner en contacto el soporte sólido con el complejo covalente de aptámero para la detección y/o cuantificación de la molécula diana.

55 En cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la muestra de ensayo se puede preparar como dos o más diluciones de la muestra de ensayo, lo que pueden aumentar el intervalo dinámico de concentraciones a las que una molécula diana puede estar presente en una muestra de ensayo, y someterse a detección mediante los métodos desvelados en el presente documento. Las muestras de ensayo de dilución individuales se analizan por separado hasta e incluyendo la formación del complejo covalente de aptámero, tras lo que las muestras de ensayo de dilución se pueden combinar para el resto del ensayo y detectarse simultáneamente en un solo soporte sólido. En una realización, cada muestra de ensayo de dilución incluye un solo aptámero, permitiendo así una sola medición de la diana correspondiente. En otra realización, se puede añadir un aptámero a dos o más diluciones, cada dilución en contacto con un aptámero marcado distinto para una determinada diana, lo que permite la detección de una señal del aptámero específica para cada una de las diferentes muestras de dilución en un solo soporte sólido. El encadenamiento de muestras diluidas entre sí de esta manera puede extender un intervalo dinámico para una sola molécula diana en muchos órdenes de magnitud y añadir exactitud cuando las regiones de cuantificación en

solapamiento conducen a múltiples determinaciones de la concentración de una sola diana.

5 En una realización, se prepara un conjunto de muestras de ensayo como diluciones en serie en las que se introduce un aptámero marcado, tal como un fotoaptámero marcado con una afinidad específica por una molécula diana. Se puede añadir el mismo aptámero con un marcador diferente a cada dilución de la muestra de ensayo. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad de aptámero y la conversión en un complejo covalente de aptámero, se pueden combinar las muestras de ensayo individuales y ponerse en contacto con un agente de marcaje, ya sea antes o después de la unión del complejo covalente de aptámero al soporte sólido. Entonces, se detecta y/o cuantifica la molécula diana, si está presente en la muestra de ensayo, mediante la detección del agente de marcaje en el complejo covalente de aptámero. Las señales resultantes detectadas para cada aptámero que tiene un marcador diferente se pueden combinar para cuantificar con exactitud la cantidad o concentración de la molécula diana en la muestra de ensayo original. Por ejemplo, la primera dilución puede generar una señal máxima para la diana, produciendo solo información semicuantitativa, mientras que la segunda dilución puede generar una señal que sea inferior a la saturación, permitiendo una cuantificación exacta de la diana en el ensayo de muestra original.

20 En otra realización, se prepara un conjunto de muestras de ensayo como diluciones en serie en las que se introduce un aptámero marcado, tal como un fotoaptámero marcado con una afinidad específica por una molécula diana. Se pueden añadir diferentes aptámeros que tienen marcadores únicos a cada dilución de la muestra. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de los complejos de afinidad de aptámero y la conversión en los complejos covalentes de aptámero, se pueden combinar las muestras de ensayo individuales y ponerse en contacto con un agente de marcaje, ya sea antes o después de la unión de los complejos covalentes de aptámero al soporte sólido. Las moléculas diana presentes en la muestra de ensayo se detectan y/o cuantifican mediante la detección del agente de marcaje en el complejo covalente de aptámero. Las señales resultantes se pueden cuantificar para intervalos de diana en muchos órdenes de magnitud en función de las diferentes diluciones en serie de la muestra original.

30 En cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, se puede comparar una muestra de ensayo con una muestra de referencia. Una "muestra de referencia" se refiere en el presente documento a cualquier material, solución o mezcla que contenga una pluralidad de moléculas, y que se sepa que incluye al menos una molécula diana. También se pueden conocer la cantidad o la concentración exactas de cualquier molécula diana presente en la muestra de referencia. La expresión "muestra de referencia" incluye muestras biológicas, tal como las definidas en el presente documento, y muestras que se pueden usar para ensayos ambientales o de toxicología, tales como los efluentes de agua e industriales contaminados o potencialmente contaminados, por ejemplo. Una muestra de referencia también puede ser un producto final, un producto intermedio o un subproducto de un proceso de preparación, por ejemplo, un proceso de fabricación. Una muestra de referencia puede incluir cualquier medio de ensayo adecuado, tampón o diluyente que se haya añadido a un material, una solución o una mezcla obtenida de un organismo o de alguna otra fuente (por ejemplo, del medio ambiente o de una fuente industrial).

40 En una realización, se trata por separado una muestra de referencia de una muestra de ensayo de una manera idéntica hasta, pero sin incluir, la exposición al agente de marcaje, que, solo en dicha realización, se debe producir antes de la unión del complejo covalente de aptámero con el soporte sólido. Se usan dos agentes de marcaje diferentes para diferenciar los niveles de diana en la muestra de referencia de los niveles de diana en la muestra de ensayo. Una vez puestas en contacto las muestras con el agente de marcaje, se pueden mezclar uniformemente y ponerse en contacto con el soporte sólido al mismo tiempo. Entonces se puede realizar una comparación directa de cualquier expresión diferencial (es decir, la cantidad o concentración diferencial de la diana en las muestras) entre la muestra de referencia y la muestra de ensayo mediante la medición de la señal de cada agente de marcaje por separado. Los dos agentes de marcaje pueden incluir un par Cy3 y Cy5, y un par Alexa555 y Alexa647. En una realización, la muestra de referencia puede ser una muestra biológica combinada que representa un grupo de control. En otra realización, la muestra de referencia puede ser una muestra biológica obtenida de un individuo, recogida en primer lugar, y la muestra de ensayo se puede obtener del mismo individuo, pero en segundo lugar, facilitando así un estudio longitudinal de un individuo mediante la medición y evaluación de cualquier cambio en la cantidad o concentración de una o más moléculas diana en múltiples muestras biológicas proporcionadas por el individuo a lo largo del tiempo.

55 En una realización, un aptámero marcado, tal como un fotoaptámero marcado con una afinidad específica por una molécula diana, se introduce tanto en una muestra de referencia como en una muestra de ensayo. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad de aptámero y la conversión en un complejo covalente de aptámero, las dos muestras se pueden poner en contacto con dos agentes de marcaje distintos, que contienen dos moléculas de detección diferentes. Entonces, se pueden unir las dos muestras marcadas por separado que contienen el complejo covalente de aptámero al soporte sólido. A continuación, se detecta y/o cuantifica la molécula diana, si está presente en una o ambas de las muestras, mediante la detección de los dos agentes de marcaje en el complejo covalente de aptámero, normalmente mediante la realización de varias exploraciones a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión cuando el marcador de detección es una molécula fluorescente, por ejemplo. Dicha cuantificación puede conducir a una evaluación más exacta de las cantidades o concentraciones diferenciales de diana en la muestra de referencia y la muestra de

ensayo, y puede facilitar las comparaciones entre las diferentes muestras de ensayo cuando la muestra de referencia empleada sea la misma.

5 En cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, se pueden usar múltiples agentes de marcaje para analizar una sola muestra de ensayo. En una realización, se pueden usar dos o más agentes de marcaje, cada uno con una química distinta para marcar diferentes restos de moléculas diana y un grupo de detección opcionalmente diferente, con una sola muestra de ensayo. Las diferentes químicas marcarán diferentes grupos funcionales en la molécula diana de la que se puede obtener información adicional. Por ejemplo, en el caso de una proteína diana, se puede unir un marcador a la diana usando química que reaccione con aminas primarias (por ejemplo, lisinas), mientras que un segundo marcador se une a la diana a través de la química que reacciona con, por ejemplo, los grupos de hidrato de carbono que normalmente están asociados con las proteínas glucosiladas. La cuantificación relativa de estos dos restos en la misma molécula diana, reconocida por un aptámero común, puede proporcionar información útil sobre el grado de glucosilación para esa diana dentro de la muestra de ensayo.

15 En una realización, se introduce un aptámero marcado, tal como un fotoaptámero marcado con una afinidad específica por una molécula diana, en una muestra de ensayo. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad de aptámero y la conversión en un complejo covalente de aptámero, la muestra de ensayo se puede poner en contacto con dos agentes de marcaje distintos, que contienen dos moléculas de detección diferentes, ya sea antes o después de la puesta en contacto del complejo de aptámero con el soporte sólido. En una realización, los marcadores de detección y las químicas son únicos, lo que permite el marcaje secuencial de la misma muestra de ensayo que contiene un complejo covalente de aptámero. En otra realización, las químicas pueden llevarse a cabo simultáneamente en una reacción. Entonces, se puede detectar y/o cuantificar el complejo covalente de aptámero marcado de manera múltiple mediante la detección de los dos agentes de marcaje en el complejo covalente de aptámero, normalmente, mediante la realización de varias exploraciones a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión cuando los marcadores de detección son, por ejemplo, moléculas fluorescentes.

30 En otra realización, dos o más agentes de marcaje distintos emplean el mismo marcador de detección. El ensayo se produce como se ha descrito anteriormente, hasta e incluyendo la conversión en un complejo covalente de aptámero, tras lo que la muestra de ensayo se divide en tantas partes alícuotas como agentes de marcaje distintos haya, y se pone en contacto cada parte alícuota de la muestra de ensayo por separado con un agente de marcaje ya sea antes o después de la unión del complejo covalente de aptámero al soporte sólido. Las partes alícuotas marcadas por separado de la muestra de ensayo que contiene el complejo covalente de aptámero se pueden detectar y/o cuantificar por separado.

35 Se puede usar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para llevar a cabo un análisis multiplexado de una muestra de ensayo. Cualquiera de dicho análisis multiplexado puede incluir el uso de al menos dos, al menos decenas, al menos cientos o al menos miles de aptámeros para ensayar simultáneamente un número igual de moléculas diana en una muestra de ensayo, tal como una muestra biológica, por ejemplo. En estas realizaciones, se introduce en la muestra de ensayo una pluralidad de aptámeros marcados, tales como fotoaptámeros marcados, que tienen cada uno una afinidad específica por una molécula diana. Como se describe además en el presente documento, tras la formación de complejos de afinidad de aptámero y la conversión en complejos covalentes de aptámero, los complejos covalentes de aptámero se unen a un soporte sólido a través de una pluralidad de sondas correspondientes que están inmovilizadas sobre el soporte sólido. Los complejos covalentes de aptámero se pueden poner en contacto con un agente de marcaje, ya sea antes o después de la unión de los complejos covalentes de aptámero al soporte sólido. Las moléculas diana presentes en la muestra de ensayo se detectan y/o cuantifican mediante la detección del agente de marcaje en el complejo covalente de aptámero.

50 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a kits útiles para realizar convenientemente cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento para analizar muestras de ensayo. Para mejorar la versatilidad de la presente divulgación, los reactivos se pueden proporcionar combinados en un envase, en el mismo o recipientes separados, de modo que la proporción de los reactivos proporcione una optimización sustancial del método y del ensayo. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados, o se pueden combinar varios reactivos en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y de la estabilidad de los reactivos.

60 Un kit comprende, en un envase combinado, al menos un aptámero marcado, un soporte sólido que incluye al menos una sonda, y un agente de marcaje adecuado. El kit también puede incluir soluciones de lavado tales como medio acuoso tamponado para la dilución de la muestra, así como el lavado de matrices, reactivos de preparación de la muestra, etcétera. Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que tienen que ocurrir durante el ensayo y optimicen aún más sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, se pueden proporcionar uno o más de los reactivos del kit en forma de un polvo seco, en general, liofilizado, incluyendo excipientes, que, tras la disolución, proporcionarán una solución de reactivos que tendrá las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con la presente invención. El kit puede incluir además una descripción por escrito de un método de acuerdo con la presente invención como se describe en

el presente documento.

En una realización ilustrativa, un kit para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo incluye al menos un aptámero que tiene afinidad específica por una molécula diana y que comprende un marcador; un agente de marcaje; y un soporte sólido, en el que el soporte sólido incluye al menos una sonda dispuesta sobre el mismo, y en el que la sonda es capaz de asociarse con el marcador en el aptámero.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1. Ensayo de fotoaptámero que mide el VEGF diluido en serie en tampón y plasma usando la captura por hibridación mediante sondas inmovilizadas en una superficie para la detección y cuantificación

El presente ejemplo ilustra las etapas del ensayo ilustrado en las Fig. 2A, 2B y 2C para un solo fotoaptámero y su proteína diana. El ensayo se realiza usando dos muestras de ensayo diferentes, tampón y plasma.

A. **Preparación de oligonucleótidos.** En este caso, se usó un marcador de oligonucleótido de ADN incluido en el extremo 3' del fotoaptámero. En este caso, el marcador era la región fija 3' usada durante el protocolo SELEX. Se sintetizó el fotoaptámero 509-80 de VEGF usando protocolos convencionales para la síntesis de ADN de fosforamidita en fase sólida usando un sintetizador convencional. El fotoaptámero que contenía 5-BrdU se escindió y desprotegió en condiciones más suaves que las convencionales en la síntesis de ADN, usando *t*-butilamina:metanol:agua en una proporción de 1:1:2 a 70 °C durante 5 horas, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el aptámero mediante precipitación en etanol seguida de HPLC de fase inversa. Se sintetizaron sondas de ADN complementarias al marcador en el fotoaptámero y que incluían un grupo reactivo de amina como se ha descrito anteriormente, y se escindieron y desprotegeron usando protocolos convencionales para el ADN. Las sondas se purificaron usando solo precipitación en etanol.

B. **Inmovilización de las sondas de captura sobre una superficie reactiva con amina.** Se sintetizó el complemento inverso del marcador de captura como se ha descrito anteriormente con una amina 5' y se acopló a la superficie de un portaobjetos reactiva con amina compuesta de un sustrato de copolímero de olefina cíclica (COC) recubierto de un copolímero de metacrilato, como se ha descrito además en la solicitud internacional número PCT/CTS2006/008877 (WO 2006/101798), presentada el 14 de marzo de 2006, titulada "Polymer Compound for Biomedical Use and Biochip Substrate Using Such a Polymer Compound", y a la que se hace referencia en el presente documento como la "superficie de copolímero de metacrilato". Se imprimieron sobre la superficie micromatrices de sondas de captura. En resumen, se hicieron reaccionar sondas de captura que contenían amina con grupos éster activos incrustados en la superficie. Se diluyeron las sondas de captura hasta 20 µM en un tampón que consistía en fosfato de sodio 300 mM, borato de sodio 25 mM (pH 9,5 a 21 °C), Tween® 20 al 0,01 % y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) 1 mM. Se depositaron sondas de captura en puntos de 250 pl por triplicado en la superficie del portaobjetos en una matriz usando un microarrayer GeneMachines OmniGrid Accent. Se incubaron los portaobjetos dispuestos en humedad al 65 % durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida de 65 °C durante 1 hora y, finalmente, durante la noche a temperatura ambiente. Se hidrolizaron el resto de los grupos de amina reactiva en NaOH 20 mM durante 5 minutos, seguido de 10 enjuagues de H₂O, y luego se secó bajo una corriente de N₂. Antes de su uso, se almacenaron los portaobjetos a oscuras a temperatura ambiente en una cámara de desecación.

Se incubó el aptámero 509-80 de VEGF a una concentración 1 nM con proteína diana VEGF diluida en serie, de 5 nM a 1,6 pM, en 100 µl de diluyente de ensayo (1 x SB17 (HEPES 40 mM, NaCl 102 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM), Tween® 20 al 0,1 %, BSA al 0,05 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque) o en plasma al 10 % (plasma al 10 % en 1 x SB18 (HEPES 40 mM, NaCl 102 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM), 200 µg/ml de ADN de esperma de arenque, Tween® 20 al 0,1 %). Se mezclaron suavemente las muestras y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se irradiaron las muestras con 1 Julio de 308 nm de luz emitida por un láser excimer (Tui Laser ExciStar S200, longitud de pulso de 10 ns, 200 Hz, 0,8 mJ por pulso). Se inició la tinción mediante la adición a cada muestra de 1 µl de succinimidil-Alexa647 a 10 mg/ml en DMSO. Se mezclaron las soluciones y se hicieron reaccionar durante la noche a 4 °C. Se interrumpió la reacción de tinción mediante la adición de 5 µl de BSA al 10 % y la incubación durante 2 horas. Finalmente, se añadieron 18 µl de NaCl 5 M y 4,5 µl de Triton al 10 % a 90 µl de las muestras de plasma. Se conectó una junta Proplate Grace a un portaobjetos que contenía las sondas inmovilizadas, creando 16 pocillos. Se incubó cada pocillo durante 15 minutos a 42 °C con 80 µl de una solución compuesta de 600 µl de NaCl 5 M, 30 µl de Tritón al 10 % y 3 ml de diluyente de ensayo. A continuación, se retiró esta solución y se reemplazó por 80 µl de muestra. Se sellaron los pocillos con película "F" Microseal y se mezcló el portaobjetos a 600 rpm, 37 °C en un termomezclador R de Eppendorf durante 3 horas. Se retiraron las soluciones de hibridación y se enjuagaron los pocillos 3 veces con una solución compuesta de SB17, Triton al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque y NaCl 1 M. A continuación, se retiró la junta y se colocó todo el portaobjetos en un frasco de pap en 30 ml de una solución compuesta de SB17, Triton al 0,5 % y NaCl 1 M durante 30 minutos, seguido de un enjuague de 2 minutos

en 1 x SB17, Tween® 20 al 0,05 %, seguido de un segundo enjuague de 30 segundos en 0,5 x SB17. Se secó el portaobjetos bajo una corriente de N₂ y se exploró con un escáner fluorescente LS300 TECAN (excitación a 633 nm/emisión a 670 nm). Se analizó la imagen TIF resultante con el programa informático ArrayVision de Imaging Research, Inc. para aislar características y calcular sus intensidades medias usando técnicas convencionales para el procesamiento de imágenes de micromatrices.

Los resultados se exponen en la Fig. 4, donde se han cuantificado los resultados del tampón (Fig. 4A) y del plasma (Fig. 4B) como se ha descrito anteriormente para la sonda de captura de aptámero de VEGF. La respuesta lineal para la dilución en serie en ambos medios, obtenida con la sustracción del control de proteína sin tampón de cada respuesta, abarca el intervalo de 2 pM a 5 nM en concentración de VEGF.

Ejemplo 2. Ensayo de fotoaptámero usando la captura por hibridación mediante sondas inmovilizadas en una superficie para la detección y cuantificación de múltiples proteínas diana en tampón

El presente ejemplo ilustra las etapas del ensayo ilustrado en las Fig. 2A, 2B y 2C en un formato multiplexado usando 10 fotoaptámeros y sus proteínas diana en tampón.

A. Preparación del fotoaptámero marcado. Se asignaron marcadores de oligonucleótido únicos a cada fotoaptámero de los complementos inversos de un conjunto de sondas de expresión génica obtenidas de la matriz Test3 GeneChip® de Affymetrix. Los fotoaptámeros marcados se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que el grupo amino se añadió en el extremo 5' de los fotoaptámeros. Antes de su uso, se calentaron las soluciones de aptámero hasta 95 °C durante 3 minutos, tras lo que se enfriaron de manera controlada hasta 37 °C a una velocidad de 0,1 °C por segundo.

B. Inmovilización de las sondas de captura sobre una superficie reactiva con amina. Se inmovilizaron los complementos inversos de los marcadores de captura como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que, en este caso, se usó una amina 3' para las sondas y que se usó Tween® 20 al 0,0025 % mientras que se eliminó el DMAP del tampón de impresión. Se incubaron los portaobjetos impresos a 65 °C durante 2 horas, tras lo que se almacenaron durante la noche en un desecador. A continuación, se trataron los portaobjetos con una solución de metoxietilamina (pH 9,5 a 37 °C) para eliminar la sonda no unida y consumir el exceso de grupos éster activos de la superficie.

El ensayo sigue el esquema expuesto en las Fig. 2A, 2B y 2C. Se usó el protocolo básico descrito en el Ejemplo 1. Sin embargo, se multiplexaron 41 fotoaptámeros y se diluyeron en serie 10 proteínas diana para un subconjunto de estos aptámeros en las muestras. Los pares de proteína:fotoaptámero cuantificados en el presente ejemplo incluyen bFGF:6-7, ERBB4:1797-38, IL-1 R4:1472-3, MCP- 3:851-90, PAI-1:1921-52, TIMP-1:90536, tPA:987-51, uPA:1162-70, VEGF:509-80, VEGF sR2:1546-23.

Se incubaron 41 fotoaptámeros, cada uno a una concentración de 2 nM, con 6 diluciones en serie de 10 proteínas diana y un control sin proteína en 100 µl de tampón de ensayo (SB17, Tween® 20 al 0,1 %) durante 30 minutos a 37 °C. Se irradiaron las muestras y se tiñeron como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción del uso de 2,1 µl de succinimidil-Alexa647, y se incubó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente a oscuras. Se detuvo la reacción de tinción mediante la adición de 25 µl de NaCl 5 M, 5 µl de Triton X-100, 13,5 µl de glicina 100 mM y 1,5 µl de 10 mg/ml de ADN de esperma de arenque, y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente a oscuras, seguido de 2 minutos a 70 °C. Antes de la hibridación, se prepararon portaobjetos con juntas dispuestos con sondas de hibridación como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se eliminó la solución de prehibridación y se añadieron las muestras de hibridación a los pocillos, y se incubaron a 45 °C durante 2 horas en una cámara húmeda. Se retiraron las soluciones de hibridación y se enjuagaron los pocillos 3 veces con una solución de lavado a 45 °C compuesta de 1 x SB17, Triton X-100 al 0,33 % y clorhidrato de guanidinio 1 M. A continuación, se retiraron las juntas y se colocó cada portaobjetos entero en un frasco de pap con el tampón de lavado durante 20 minutos a 45 °C, tras lo que se enjuagaron durante 2 minutos en 1 x SB17, Tween® 20 al 0,1 % y un enjuague final en 0,25 x SB17. Se secó el portaobjetos, se examinó y se cuantificó como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se exponen en la Fig. 5, que ilustra la señal generada a partir del ensayo multiplexado para concentraciones de proteína que varían de 10 pM a 1 nM en tampón para diez proteínas diana.

Ejemplo 3. Ensayo de fotoaptámero usando la captura por hibridación mediante sondas inmovilizadas en una superficie para la detección y cuantificación de múltiples proteínas diana en suero

El presente ejemplo demuestra la utilidad del ensayo ilustrado en las Fig. 2A, 2B y 2C en un formato multiplexado usando 57 fotoaptámeros para mediciones en muestras de suero.

A. Preparación de fotoaptámero marcado. Los fotoaptámeros marcados se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 2.

B. Inmovilización de sondas de captura en una superficie reactiva con amina. Los complementos inversos de

los marcadores de captura se inmovilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Se dividieron los 57 fotoaptámeros en dos grupos para la multiplexación, uno de 27 aptámeros hacia dianas poco abundantes y otro de 30 aptámeros hacia dianas muy abundantes en suero o plasma humano. Se prepararon 14 muestras de suero en dos diluciones y se mezclaron con los dos conjuntos de aptámeros, dando una concentración final de 1 nM para cada aptámero y suero al 10 %, 0,9 x SB1, Tween® 20 al 0,1 %, 50 mg/ml de ADN largo de esperma de arenque, 10 mg/ml (BrdU)₃₀ para el conjunto de los 27 aptámeros y suero al 1 %, 0,99 x SB1, Tween® 20 al 0,1 %, 5 mg/ml de ADN largo de esperma de arenque, 1 mg/ml de (BrdU)₃₀ para el conjunto de los 30 aptámeros. SB1 se compone de HEPES 40 mM, NaCl 102 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1 mM. Se equilibraron las muestras, se reticularon y se tiñeron como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se detuvo la reacción de tinción mediante la adición de 10 µl de BSA baja en ácidos grasos (FA) al 10 %, 25 µl de NaCl 5 mM, 5 µl de Triton X100 al 10 % y 7 µl de glicina 100 mM, y se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente. Tras la inactivación, se añadieron 1,5 µl de SDS al 10 % y se calentaron las muestras hasta 42 °C durante dos minutos.

Se prepararon portaobjetos con juntas como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se incubaron con 1 x SB1, Tween® 20 al 0,1 %, BSA baja en ácidos grasos (FA) al 0,66 %, NaCl 830 mM, Triton X100 al 0,33 %, SDS al 0,1 %, 50 mg/ml de ADN largo de esperma de arenque y 10 mg/ml de (BrdU)₃₀ durante 15 minutos. Se retiró el tampón de prehibridación, se añadieron las muestras teñidas y se incubaron en una cámara húmeda a 60 °C durante 2 horas. Tras la hibridación, se lavaron, se secaron, se exploraron y se cuantificaron los portaobjetos como se ha descrito en el Ejemplo 2.

La Fig. 6 muestra las señales cuantificadas de las imágenes exploradas para las mediciones replicadas de los 57 fotoaptámeros para las muestras de suero de dos individuos. Las mediciones demostraron ser altamente reproducibles, con correlaciones de Pearson mejores que 0,99 para las mediciones de aptámero entre las muestras replicadas.

Ejemplo 4. Desafío cinético con dilución en ensayos de fotoaptámero usando la captura por hibridación mediante sondas inmovilizadas en una superficie

El presente ejemplo ilustra el uso de dos etapas opcionales en el ensayo representado en la Fig. 3, un desafío cinético seguido de la eliminación de proteína libre. El desafío cinético, realizado por dilución, ilustra la pérdida de complejos no específicos de proteína-aptámero con la retención de los complejos de afinidad de aptámero-diana en plasma. El presente ejemplo también ilustra el uso de la captura de perlas para concentrar la muestra tras la dilución y permitir la extracción de proteína libre antes de la tinción.

A. Preparación del fotoaptámero marcado 987-51. El fotoaptámero marcado se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 2.

B. Inmovilización de sondas de captura sobre una superficie de reactiva con amina. Los complementos inversos de los marcadores de captura se inmovilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Se mezcló el fotoaptámero 987-51 a una concentración 20 nM con dos controles sin proteína y 10 concentraciones diluidas en serie de proteína diana tPA, bien en tampón de ensayo (SB17, Tween® 20 al 0,1 %) o plasma (plasma al 10 % en SB18, Tween® 20 al 0,1 %). Para evaluar la respuesta en ausencia de un desafío cinético, se prepararon dos muestras de control adicionales tanto en tampón como en plasma, uno sin proteína y otro con la concentración de proteína más alta. Estas 28 muestras en volúmenes de 10 µl, 14 para cada tampón y plasma, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Las primeras 12 muestras, tanto en tampón como en plasma, se diluyeron 50 veces mediante la adición de SB17, Tween® 20 al 0,1 % y se incubaron durante 5 minutos, seguido de la irradiación de las veintiocho muestras con 1 J de luz UV (fuente de luz filtrada de lámpara de Hg OAI). Tras la irradiación, se diluyeron las dos muestras restantes cada una en tampón y plasma 50 veces como se ha descrito anteriormente.

Se ajustó cada muestra a NaCl 1 M y se incubó a 45 °C durante 90 minutos con 25 µg de perlas paramagnéticas Dynal acopladas a un oligonucleótido complementario al extremo 3' del aptámero 987-51. Se centrifugaron las muestras a 1.000 g durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las perlas 3 veces con 100 µl de SB17, Tween® 20 al 0,1 %. Se suspendieron las perlas en bicarbonato de sodio 100 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,02 %, 0,2 mg/ml de colorante Alexa647-NHS, y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó la solución de tinción y se reemplazó por 100 µl de SB17, Tween-20 al 0,1 %, glicina 10 mM para inactivar la reacción de tinción. A continuación, se lavaron las perlas 3 veces con volúmenes de 100 µl de tampón de lavado de guanidina (SB17, Tween-20 al 0,1 %, Triton X-100 al 0,33 %, clorhidrato de guanidina 1 M), se suspendieron en 70 µl de Triton X-100 al 0,33 %, 1 mg/ml de sulfato de dextrano y se calentaron hasta 95 °C durante 5 minutos para eluir los aptámeros de las perlas magnéticas. Se prepararon portaobjetos con juntas y se prehibridaron como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se transfirieron 65 µl de cada sobrenadante que contenía aptámeros eluidos a un pocillo que contenía 25 µl de NaCl 3,6 M, HEPES 144 mM, Triton X-100 al 0,33 %. Se incubaron los portaobjetos en una cámara húmeda a 45 °C durante la noche, luego se lavaron, se secaron, se exploraron y se cuantificaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

La Fig. 7 muestra una representación gráfica de los resultados en tampón (●) y plasma (▲) después de la dilución de 50 veces. La señal obtenida a partir de las muestras de control con alto contenido de proteína sin dilución ((o) tampón, (Δ) plasma) coincide bien con los valores diluidos, lo que indica poca pérdida de señal diana durante el desafío cinético. El RFU de plasma sin proteína sin y con dilución es 838 RFU (□ a 0,1 pM) y 131 RFU (Δ), lo que resulta en una caída del 84 % de la señal, presumiblemente debida a la eliminación de los complejos no específicos de aptámeros durante el desafío cinético.

Ejemplo 5. Desafío cinético con competidores en ensayos de fotoaptámero usando la captura por hibridación mediante sondas inmovilizadas en una superficie

El presente ejemplo ilustra la etapa opcional de introducir un desafío cinético en el ensayo representado en la Fig. 3. El desafío cinético, realizado en el presente ejemplo mediante la adición de una molécula competidora, ilustra la pérdida de complejos no específicos de aptámero-proteína manteniendo a la vez los complejos de afinidad de aptámero-diana en plasma.

A. Preparación del fotoaptámero marcado 987-51. El fotoaptámero marcado se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 2.

B. Inmovilización de sondas de captura sobre una superficie de reactiva con amina. Los complementos inversos de los marcadores de captura se inmovilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Se mezcló el fotoaptámero 987-51 a una concentración 20 nM con un control sin proteína y 6 concentraciones diluidas en serie de proteína diana tPA en plasma al 10 % diluido en SB18, Tween® 20 al 0,1 %. Se prepararon dos conjuntos de muestras para facilitar las comparaciones entre las muestras con y sin adición de competidor. Cada solución se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Tras 30 minutos de equilibrado, se añadió la mitad de cada muestra de un conjunto al mismo volumen de competidor dN₁₅ 550 μM en SB17, Tween® 20 al 0,1 % a 37 °C y se incubó durante 9 minutos, seguido de la irradiación como se ha descrito en el Ejemplo 4. Tras la irradiación, se añadió SB17, Tween-20 al 0,1 %, al conjunto de muestras sin competidor para igualar el volumen de la adición de competidor. Se tiñeron las muestras como se ha descrito en el Ejemplo 4, a excepción de que el tiempo de incubación fue de 2 horas. Se detuvo la reacción de tinción con la adición de 45 μl de NaCl 0,83 M, Triton X-100 al 0,33 %, 0,1 mg/ml de ADN largo de esperma de arenque y glicina 9 mM. Se mezclaron las muestras y se incubaron a oscuras a temperatura ambiente durante 40 minutos, tras lo que se calentaron hasta 70 °C durante 2 minutos.

Se prepararon portaobjetos con juntas como se ha descrito en el Ejemplo 2 y se incubaron en una solución de SB18, Tween® 20 al 0,1 %, Triton X-100 al 0,33 % y 100 μg/ml de ADN largo de esperma de arenque. Se añadieron muestras a los pocillos de los portaobjetos y se incubaron en una cámara húmeda a 45 °C durante la noche, y luego se lavaron, se secaron, se exploraron y se cuantificaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Fig. 8, donde se presentan las curvas de dosis-respuesta para tPA en plasma con y sin la adición de competidor. El valor del plasma sin adición de proteína se reduce en un 70 % debido a la adición del competidor, mientras que la respuesta a la concentración de diana más alta permanece invariable en presencia competidor.

Ejemplo 6. Desafío cinético con captura de perlas y lavado de complejos de afinidad de aptámero en ensayo de fotoaptámero usando captura por hibridación mediante sondas inmovilizadas en una superficie

El presente ejemplo ilustra la etapa opcional de introducir un desafío cinético en el ensayo representado en la Fig. 3. El desafío cinético del presente ejemplo se lleva a cabo mediante la captura de complejos de afinidad de aptámero sobre perlas y el lavado de los complejos inmovilizados de manera que las proteínas diana disociadas se eliminen antes de la reticulación.

A. Preparación de los fotoaptámeros marcados 987-51, 1152-1146 y 1920-1. Los fotoaptámeros marcados se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 2.

B. Inmovilización de sondas de captura sobre una superficie reactiva con amina. Los complementos inversos de los marcadores de captura se inmovilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Se mezclaron los fotoaptámeros 987-51, 1152-46 y 1920-1 a la concentración 4 nM con sondas biotiniladas complementarias a la secuencia de marcador única de cada fotoaptámero a la concentración 8 nM, y se incubaron durante 15 segundos a 95 °C y, a continuación, se enfriaron lentamente a 0,1 °C por segundo hasta 37 °C. Se mezclaron los complejos de fotoaptámero-sonda biotinilada a una concentración de fotoaptámero 0,2 nM:sonda 0,4 nM con un control sin proteínas y 6 concentraciones diluidas en serie de proteínas diana de tPA, PAI-1 e IL-6, bien en tampón de ensayo (SB17, Tween® 20 al 0,1 %) o plasma (plasma al 10 % en SB18, Tween® 20 al 0,1 %). Se incubaron estas 14 muestras en volúmenes de 100 μl, 7 para tampón y 7 para plasma, durante 30 minutos a 37 °C,

tras lo que se añadieron 50 µg de perlas de estreptavidina Dynal MyOne a cada muestra y se incubaron durante 2 minutos a 37 °C con mezclado para capturar los complejos de fotoaptámero:sonda biotinilada:proteína no covalentes. Se lavaron las perlas 3 veces durante 30 segundos con 100 µl de SB17, Tween® 20 al 0,1 %, 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque, se volvieron a suspender en 100 µl de lo mismo y se irradiaron con 4 J de luz UV (fuente de luz filtrada de lámpara de Hg OAI) con mezclado.

Se lavaron las perlas una vez con bicarbonato de sodio 100 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,1 %, se volvieron a suspender en bicarbonato de sodio 100 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,1 %, 0,2 mg/ml de colorante Alexa647-NHS, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se lavaron las perlas 3 veces con 100 µl de SB17, Tween® 20 al 0,1 %, Triton X-100 al 0,33 %, clorhidrato de guanidina 1 M, glicina 25 mM, una vez con 100 µl de SB17, Tween® 20 al 0,1 %, Triton X-100 al 0,33 %, y se suspendieron en 95 µl HEPES 40 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 0,33 % y se calentaron hasta 70 °C durante 5 minutos para eluir los aptámeros de las perlas magnéticas. Se prepararon portaobjetos con juntas y se prehibridaron como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se combinaron 90 µl de cada sobrenadante que contenía aptámeros eluidos con 30 µl de HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 3 M, Triton X-100 al 0,33 %, se incubaron durante 2 minutos a 70 °C, y se transfirieron 110 µl de cada uno a los pocillos de los portaobjetos. Se incubaron los portaobjetos en una cámara húmeda a 45 °C durante la noche. Se retiraron las muestras y se enjuagaron tres veces con 150 µl de SB17, Tween® 20 al 0,1 %, Triton X-100 al 0,33 %, clorhidrato de guanidina 1 M a 45 °C. Se desmontaron los portaobjetos con juntas, se colocaron en un frasco de pap que contenía 30 ml de SB17, Tween® 20 al 0,1 %, Triton X-100 al 0,33 %, clorhidrato de guanidina 1 M, y se mezclaron por rotación durante 20 minutos a 45 °C. A continuación, se transfirieron los portaobjetos a un frasco de pap que contenía 30 ml de SB17, Tween® 20 al 0,1 %, y se mezcló por rotación durante 2 minutos a 20 °C, se transfirió a un frasco de pap que contenía 30 ml de 0,2 x SB17, Tween® 20 al 0,02 % durante 15 segundos sin mezclar, y se secó, se exploró y se cuantificó como se ha descrito en el Ejemplo 2.

La Fig. 9 muestra una representación gráfica de los resultados para el aptámero tPA 987-51 (Fig 9A.), el aptámero PAI-1 1152-46 (Fig. 9B) y el aptámero IL-6 1920-1 (Fig. 9C) en tampón (●) y plasma (▲). Los valores de RFU se han corregido restando el valor de RFU de tampón sin proteína para cada aptámero. Los valores de RFU de plasma sin proteína corregidos para estos aptámeros (Δ a 1 pM) son 66, 26 y 49 RFU, respectivamente.

Ejemplo 7. Eliminación del fotoaptámero libre en el ensayo de fotoaptámero usando captura por hibridación mediante sondas inmovilizadas en una superficie

El presente ejemplo ilustra la etapa opcional de eliminación del aptámero libre antes de la captura por hibridación en la superficie, como se representa en la Fig. 3. El aptámero libre se elimina por precipitación de la proteína y los complejos covalentes de aptámero-proteína por K⁺/SDS, mientras que el aptámero libre permanece en solución. Se desecha el sobrenadante que contiene aptámero libre y se suspende el sedimento para completar la etapa.

A. Preparación de fotoaptámeros marcados. El fotoaptámero marcado se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 2

B. Inmovilización de sondas de captura sobre una superficie reactiva con amina. Los complementos inversos de los marcadores de captura se inmovilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Se prepararon las reacciones de unión en SB18 como se ha descrito en el Ejemplo 1 para contuvieran una concentración final de fotoaptámero de 2 nM y proteínas diana diluidas en serie de 2 nM a 0,64 pM además de un control sin proteínas. Se incubaron las reacciones a 37 °C durante 30 minutos y se irradiaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se transfirieron las muestras a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 10 µl de plasma combinado. Se añadieron 300 µl de la siguiente solución de SDS a cada muestra: SDS al 1,33 %, 1,33 µg/ml de ARNt y HEPES 10 mM (pH 7,5) (400 µl de volumen final). Se agitaron las muestras vigorosamente durante 10 segundos, y a continuación, se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se añadieron 6 µl de KCl 2,5 M a cada reacción y se agitaron vigorosamente las muestras durante 10 segundos y luego se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Se sedimentaron los precipitados por centrifugación a 8.000 g durante 5 minutos a 4 °C en un microcentrifugador. Se desecharon los sobrenadantes resultantes. Se lavaron los sedimentos añadiendo KCl 200 mM frío, HEPES 10 mM (pH 7,5), seguido de mezcla de vórtice suave durante 5 segundos. Se volvió a sedimentar el precipitado de nuevo por centrifugación a 8.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Se desecharon los sobrenadantes lavados. Se suspendió cada sedimento en 200 µl de agua caliente (> 37 °C), EDTA 1 mM, HEPES 10 mM (pH 7,5). Se añadieron las perlas paramagnéticas descritas en el Ejemplo 4 a cada muestra, y se mezcló vigorosamente la suspensión de microesferas a 50 °C durante 30 minutos. Usando un imán de placa de micropocillos, se lavaron las perlas 3 veces con 100 µl de SB17, tampón de Tween® 20 al 0,1 %. Se suspendieron las perlas en tampón de carbonato (pH 8,5) que contenía 0,2 mg/ml de NHS-Alexa647 reactivo con amina y se incubaron a 25 °C durante 60 minutos con mezclado constante. Se detuvo la reacción, se lavaron las perlas, se eluyeron los aptámeros y se hibridaron como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se exploraron los portaobjetos y se cuantificaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 10 muestra los resultados para las muestras tratadas con y sin eliminación del aptámero libre. Las señales

son más altas cuando los aptámeros no complejados se eliminan de la muestra antes de introducir la muestra en las sondas.

Ejemplo 8. Generación de señal de ensayo UPS en condiciones que afectan a la señal del complejo de afinidad de aptámero pero no al complejo covalente de aptámero

El presente ejemplo demuestra el efecto de la unión covalente de una molécula diana a su fotoaptámero cuando se usan detergente y una alta concentración de sal durante la hibridación del complejo de fotoaptámero con su sonda en el soporte sólido. Se comparan los resultados de un ensayo realizado con y sin reticulación covalente, mediado en este caso por fotoactivación, para una muestra de plasma y una muestra que contiene bFGF en tampón.

A. Preparación del fotoaptámero marcado 6-7. El marcador de oligonucleótido usado en el presente documento fue la región fijada 3' usada durante el protocolo SELEX. El fotoaptámero bFGF 6-7 se sintetizó como se ha descrito en el Ejemplo 1.

B. Inmovilización de sondas de captura sobre una superficie reactiva con amina. Los complementos inversos de los marcadores de captura se inmovilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Se preparó 6-7 1 nM en las soluciones de unión de tampón y de plasma como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se añadió proteína bFGF 10 nM a la muestra de tampón solamente. Se mezclaron las muestras suavemente y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se irradió un conjunto de muestras como se ha descrito en el Ejemplo 1 y un conjunto repetido de las muestras no se irradió. Se tiñeron las muestras como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que el tiempo de reacción fue de 3 horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de 10 µl de BSA, 25 µl de NaCl 5 M y 5 µl de Triton X-100 al 10 % y una incubación de 2 horas. Se preparó el portaobjetos como en el Ejemplo 1 y se añadieron 80 µl de una solución de prehibridación (500 µl de NaCl 5 M y 100 µl de Triton al 10 % a 2 ml de tampón de muestra) a cada pocillo durante 15 minutos a 42 °C. Se retiró la solución de prehibridación y se reemplazó por 80 µl de muestra. Se sellaron los pocillos con una película "F" de Microseal y, a continuación, se mezclaron los portaobjetos a 600 rpm, 40 °C en un termomezclador R de Eppendorf durante 2 horas, seguido de 20 minutos a 35 °C. Se enjuagaron los pocillos dos veces con 1 x SB17, Triton al 0,5 %, NaCl 1 M y después se incubaron en el segundo lavado durante 15 minutos. Tras la hibridación, se trató el portaobjetos como se ha descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que las 3 veces de lavado fueron de 15 minutos, 2 minutos y 30 segundos. Se secó el portaobjetos, se exploró y se cuantificó como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Los resultados para el fotoaptámero bFGF 6-7 se presentan en la Fig. 11. Las señales obtenidas para bGFG 10 nM en tampón y en plasma al 10 % se observan dependientes de la luz. La señal en las muestras sin luz, donde no puede ocurrir la unión covalente de la diana con el fotoaptámero, es comparable a la señal observada fuera de una característica, denominada "fondo general" en el presente documento. La concentración endógena de bFGF en el plasma al 10 % es bastante baja, como se refleja en la baja señal en el plasma frente a la respuesta de señal sin luz y de fondo general.

Ejemplo 9. Detección de C4b reticulado a un fotoaptámero de ADN compuesto de los nucleótidos 5-bencil-dT y 5-bromo-dC en tampón

El presente ejemplo ilustra la actividad de los fotoaptámeros que contienen nucleótidos modificados en el formato de ensayo ilustrado en las Fig. 2A, 2B y 2C. El fotoaptámero de ADN (1987-74) hacia la proteína C4b se compone de los nucleótidos 5-bencil-dT y 5-bromo-dC en lugar de los dT y dC convencionales.

A. Preparación de fotoaptámero 1987-74 marcado. Se amplificaron insertos vectoriales que contenían las secuencias de aptámero a partir de células de *E. coli* por PCR con cebadores específicos de las regiones de aptámero fijadas. Se biotiniló el cebador 3', permitiendo la captura del producto de PCR sobre perlas de estreptavidina MyOne. Después del lavado, se eliminó la cadena no biotinilada del dúplex capturado con un lavado de NaOH 20 mM, y se crearon los aptámeros mediante la extensión del cebador con un oligonucleótido con un marcador de captura único acoplado a la secuencia del cebador 5'. La extensión del cebador se realizó con el molde de ADN todavía acoplado a la perla de estreptavidina en una mezcla que contenía dATP, 5-Br-dCTP, dGTP y 5-bencil-dUTP usando ADN polimerasa de KOD para incorporar los nucleótidos modificados. Se recogió el aptámero de las perlas con un lavado de NaOH 20 mM seguido de la neutralización con HCl.

B. Inmovilización de sondas de captura sobre una superficie reactiva con amina. Los complementos inversos de los marcadores de captura se inmovilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Se incubó una concentración final de 2 nM de 1987-74 con una serie de diluciones de proteína C4b en SB17, de Tween® 20 al 0,1 % a las siguientes concentraciones: 25 nM, 5 nM, 1 nM, 0,2 nM, 0.04 nM y un control sin proteína. Se equilibraron las muestras y se irradiaron como en el Ejemplo 1, tras lo que se añadieron 2 µl de ADN de esperma de arenque (10 mg/ml). Se marcó con fluorescencia la proteína C4b mediante la adición de 7,5 µl de NHS-Alexa-647 (1,33 mg/ml en DMSO) a cada muestra y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 25 µl de NaCl 5 M, 5 µl de Triton-100 al 10 % y 1 µl de glicina 100 mM para inactivar el marcador sin reaccionar, interrumpir

las interacciones no covalentes y facilitar la posterior hibridación.

Se prepararon portaobjetos con juntas como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se incubaron con una solución que contenía SB17, Tween® 20 al 0,1 %, NaCl 0,8 M, 20 µg/ml de ADN de esperma de arenque y Triton X-100 al 0,33 % durante 15 minutos a 42 °C. Después de retirar la solución, se añadieron 80 µl de muestra marcada al portaobjetos, uno por cada submatriz, y se incubó durante 30 minutos a 42 °C en una plataforma giratoria. Se retiraron las muestras y se lavaron los sustratos dos veces con la solución de prehibridación, una vez con solución de prehibridación sin ADN de esperma de arenque o Tween® 20, una vez con 1 x SB17, Tween® 20 al 0,1 %, y una vez con 0,25 x SB17. A continuación, se secaron los portaobjetos, se exploraron y se cuantificaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 12 muestra la curva de dosis-respuesta resultante de 1987-74 obtenida en función de la concentración diana, que ilustra la actividad de los aptámeros de nucleótidos modificados en el ensayo.

Ejemplo 10. Ensayo de captura por hibridación UPS en dos superficies diferentes usando dos métodos de tinción independientes

El presente ejemplo demuestra la funcionalidad del ensayo en dos superficies de diferente composición, la superficie de copolímero de metacrilato de los ejemplos anteriores y una superficie reactiva con amina Schott Nexterion sobre un sustrato de vidrio. Además, se lleva a cabo la reacción de tinción de proteínas dianas como en los ejemplos anteriores mediante la unión directa de Alexa-647 a la proteína diana o marcando primero la proteína diana con biotina seguido del marcaje con estreptavidina-Alexa-647. El ensayo permite la detección cuantitativa de la proteína VEGF en tampón usando bien la superficie o el método de tinción.

A. Preparación de fotoaptámero marcado 509-80. Los fotoaptámeros marcados se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1.

B. Inmovilización de sondas de captura sobre superficie reactiva con amina. Se sintetizó la sonda de captura con una amina 5' como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se inmovilizó en ambas superficies. La inmovilización en el portaobjetos Schott Nexterion se llevó a cabo mediante la disolución de la sonda, ya sea a 40 o 20 µM en un tampón compuesto de fosfato de sodio 300 mM (pH 8,5), Tween® 20 al 0,005 % y sarcosilo al 0,001 %. Se depositaron las sondas de captura como se ha descrito en el Ejemplo 1. Tras la deposición de la sonda, se incubaron los portaobjetos durante la noche en una caja seca y después se incubaron con bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,5) y Tween® 20 al 0,1 % durante 8 horas a temperatura ambiente. Luego, se enjuagaron los portaobjetos con agua 10 veces y se secaron bajo una corriente de N₂. Se inmovilizó la sonda de captura sobre la superficie de copolímero de metacrilato mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 1.

Se incubó el aptámero 509-80 de VEGF a concentración de 1 nM en un volumen de 100 µl con 6 concentraciones de VEGF diluidas en serie, de 50 nM a 16 pM, y un control sin proteína en diluyente de ensayo (SB17, Tween® 20 al 0,1 %, BSA al 0,05 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque). Se mezclaron las muestras suavemente y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, tras lo que se irradiaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se dividieron las muestras y se tiñeron directamente con NHS-Alexa-647 o mediante la reacción con NHS-PEO₄-biotina y, posteriormente, se tiñeron con estreptavidina Alexa-647. Para la tinción con NHS-Alexa-647, se usó el procedimiento del Ejemplo 1, excepto que la reacción se produjo a temperatura ambiente durante 4 horas. Para la reacción con NHS-PEO₄-biotina, se añadió 1 µl de NHS-PEO₄-biotina 20 mM disuelto en DMSO a 100 µl de muestra. Se mezcló la solución y se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se detuvieron ambas reacciones de tinción mediante la adición de 23 µl de NaCl 5 M, 11,4 µl de BSA al 10 % y 1,1 µl de Triton X-100 al 10 % y se dejó incubar durante 2 horas.

Se sellaron con una junta los dos portaobjetos diferentes como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se prehibridaron con 1 x SB17, Triton X-100 al 0,1 %, BSA al 0,5 % y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque durante 15 minutos a 42 °C. Se retiró la solución y se reemplazó por 80 µl de muestra. Se sellaron los pocillos con película "F" Microseal y se mezclaron los portaobjetos a 600 rpm, 42 °C en un termomezclador R de Eppendorf durante 3 horas, seguidas de 1 hora a 34 °C. Para las muestras marcadas directamente con NHS-Alexa-647, se lavaron los pocillos 3 veces con 1 x SB17, Triton X-100 al 0,5 % y NaCl 1 M. Se retiró la junta y se colocó todo el portaobjetos en un frasco de pap en 30 ml de SB17, Triton al 0,5 %, NaCl 1 M durante 30 minutos, seguido de un enjuague de 2 minutos en 1 x SB17, Tween® 20 al 0,1 %, seguido de un enjuague de 20 segundos en 0,25 x SB17. Para las muestras que se habían hecho reaccionar con NHS-PEO₄-biotina, se enjuagaron los pocillos 3 veces con 1 x SB17, Tween® 20 al 0,1 %, NaCl 0,5 M, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque, BSA al 0,5 % (tampón de tinción de estreptavidina). Se preparó una solución de 4 µg/ml de estreptavidina-Alexa 647 en tampón de tinción de estreptavidina y se añadieron 80 µl de esta solución a cada pocillo durante 15 minutos a 37 °C. A continuación, se enjuagaron los pocillos 3 veces con 1 x SB17, Tween® 20 al 0,1 %. Se retiró la junta y se colocó todo el portaobjetos en un frasco de pap de 30 ml en 1 x SB17, Tween® 20 al 0,1 % durante 30 minutos, seguido de un enjuague 20 segundos en 0,25 x SB17. Los portaobjetos se secaron, se exploraron y se cuantificaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La Fig. 13 muestra los resultados para la superficie Schott Nexterion (Fig. 13A) y la superficie de copolímero de

metacrilato (Fig. 13B) para la respuesta a la dosis en función de la concentración de proteínas. Ambas superficies dan resultados cuantitativos similares, lo que demuestra la independencia en la superficie del ensayo. También se observa que las dos estrategias de tinción son comparativamente eficaces.

5 **Ejemplo 11. Detección de proteínas diana VEGF y bFGF en tampón y suero mediante captura por hibridación de las proteínas fotorreticuladas en una matriz GeneChip® Test3 de Affymetrix en una superficie de cuarzo recubierta**

10 El presente ejemplo demuestra la utilidad de otra superficie más, una matriz GeneChip® Test3 de Affymetrix (superficie de vidrio de cuarzo), para la etapa de captura por hibridación del ensayo. Los ensayos se realizaron tanto en tampón como en suero.

15 **A. Síntesis de fotoaptámero marcado 509-80 y 6-7.** Se asignaron los complementos inversos de las dos sondas designadas 201 y 1121 en la matriz GeneChip® Test3 de Affymetrix a los aptámeros 509-80 y 6-7, y se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1.

B. Inmovilización de sondas de captura sobre superficie reactiva con amina. Se adquirió una matriz GeneChip® Test3 en Affymetrix con sondas que se sintetizaron *in situ*.

20 Se preparó un volumen de 100 µl de aptámero 509-80 de VEGF y aptámero 6-7 de bFGF, cada uno a una concentración de 2 nM, con proteína VEGF y bFGF 20 nM en diluyente de ensayo (1 x SB17, Tween® 20 al 0,1 %, BSA al 0,02 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque). Se mezclaron las muestras suavemente y se incubaron a 37 °C durante 60 minutos, a continuación, se irradiaron y se tiñeron con NHS-PEO₄-biotina como se ha descrito en el Ejemplo 9, excepto que el tiempo de reacción fue de 1 hora. Se detuvo la reacción mediante la adición de 10 µl de BSA al 10 %, 1 µl de 10 mg/ml de ADN de esperma de arenque, 5 µl de Triton X-100 al 10 % y 25 µl de NaCl 5 M. Se añadieron 10 µl de suero a una muestra para aproximarse a una muestra de suero al 10 %.

25 Se incubaron matrices GeneChip® Test3 de Affymetrix con 100 µl de una solución compuesta de 100 µl de diluyente de ensayo, 10 µl de BSA al 10 %, 1 µl de 10 mg/ml de ADN de esperma de arenque, 25 µl de NaCl 5 M, 5 µl de Triton X-100 al 10 % y 7 µl de DMSO durante 1 hora a 45 °C, tras lo que se añadieron 100 µl de la muestra a la cámara de la matriz Test3 y se incubaron durante 60 minutos a 45 °C y luego se enjuagaron con un tampón compuesto de 1 x SB1, Triton X-100 al 0,5 % y NaCl 1 M. A continuación, se colocaron las matrices en estación de fluidos GeneChip® de Affymetrix, que realiza los procedimientos de lavado y tinción convencionales de Affymetrix. Luego se leyeron y cuantificaron las matrices en el escáner de Affymetrix. Los resultados se exponen en la Fig. 14. 30 En tampón (Fig. 14A), el aptámero VEGF se hibrida a la sonda 201 (indicada como 1 en la figura) con una intensidad de 3.500 RFU, y el aptámero de bFGF se hibrida a la sonda 1121 (indicada como 2 en la figura) con una intensidad de 23.000 RFU. En el suero (Fig. 14B), las intensidades relativas son 5.000 (1) y 18.000 (2) para los aptámeros de VEGF y bFGF.

40 **Ejemplo 12. Pasivación de la superficie de una matriz GeneChip® Test3 de Affymetrix sobre una superficie de cuarzo recubierta mediante el prebloqueo con leche desnatada, Superblock o plasma no teñido**

El presente ejemplo ilustra la pasivación de la superficie a la adsorción de suero y plasma en una matriz GeneChip® Test3 de Affymetrix mediante el bloqueo con leche desnatada, Superblock o plasma no teñido.

45 **A. Preparación de oligonucleótidos biotinilados.** Se sintetizaron oligonucleótidos biotinilados que se hibridan con tres sondas diferentes inmovilizadas en la matriz GeneChip® Test3, indicadas como 201, 1121 y 108, como se ha descrito en el Ejemplo 1.

50 **B. Biotinilación del plasma.** Se añadieron 160 µl de NHS-PEO₄-biotina 21 mM a 100 ml de plasma al 10 % en 1 x SB18, Tween® 20 al 0,1 %, y se dejó reaccionar la solución durante 2 horas y luego se detuvo con la adición de 1 ml de glicina 100 mM (pH 7,5). El plasma biotinilado se almacenó a -20 °C.

55 El tampón de control se compone de 0,75 x SB17, BSA al 0,1 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque, Tween® 20 al 0,1 % y NaCl 0,8 M. Se preparó plasma biotinilado al 10 % con el tampón de control y plasma biotinilado. Se trató previamente el plasma mediante la adición de 50 µl de Triton X-100 al 10 %, 10 µl de SDS al 10 % y 10 µl de 10 mg/ml de ADN de esperma de arenque a 1 ml de plasma biotinilado al 10 %, calentando hasta 95 °C durante 10 minutos y después añadiendo 200 µl de NaCl 5 M. Se añadió 1 µl de 1.000 x mezcla de sonda biotinilada a 1 ml bien de tampón de control o de plasma al 10 %.

60 Se incubaron cuatro matrices Test3 de Affymetrix con 1 x SB17, BSA al 1 %, Triton X-100 al 0,4 %, SDS al 0,1 %, NaCl 1 M y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque. Se bloqueó la matriz B con una solución de leche en polvo desnatada al 2 % (Nestle Carnation, INSTANT NONFAT DRY MILK) suspendida en PBS, SDS al 0,1 % y 0,4 %. Se bloqueó la matriz C con una solución de StarterBlock (PIERCE), SDS al 0,1 % y 0,4 %. Se bloqueó la matriz D con una solución de plasma combinado al 10 %, SDS al 0,1 % y Triton X-100 al 0,4 %. Se calentó cada solución de 65

bloqueo hasta 95 °C durante 10 minutos y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente antes de la adición a la matriz. Cada matriz Test3 se bloqueó con 100 µl de la solución de bloqueo respectiva durante 1,5 horas a 45 °C. Se añadieron 100 µl de la muestra a cada matriz. La matriz A recibió el tampón de control con sondas y las matrices B, C y D recibieron el plasma al 10 % con sondas. Se incubaron las matrices a 45 °C durante 45 minutos.

A continuación, se enjuagaron las matrices con 1 x SB17, Triton X-100 al 0,4 %, SDS al 0,1 %, NaCl 1 M, BSA al 1 % haciendo fluir 1 ml de lavado a través de la cámara, permitiendo que la matriz se incubara durante 5 minutos, a continuación, luego haciendo fluir otro ml a través de la cámara y, finalmente, reemplazando los últimos 100 µl de lavado por 100 µl de lavado recién preparado. Este procedimiento se realizó 3 veces. Las matrices se incubaron durante aproximadamente 1 hora antes de colocarlas en la estación de fluidos GeneChip® de Affymetrix y realizar la lectura en el escáner de Affymetrix.

Los resultados se exponen en las Fig. 15A-D. El fondo general sobre las cuatro matrices fue de 40, 300, 400 y 500 RFU, mientras que las tres sondas biotiniladas miden -17.000, -34.000 y 18.000 en las matrices.

Ejemplo 13. Detección de proteínas diana mediante captura por hibridación de proteínas fotorreticuladas en una matriz GeneChip® Test3 previamente bloqueada con leche desnatada

El presente ejemplo ilustra la captura por hibridación de proteínas diana IL-1 R4 y bFGF en una matriz GeneChip® Test3 de Affymetrix sobre superficies de vidrio recubiertas bloqueadas con leche desnatada.

A. Síntesis del fotoaptámero 1472-3 y 6-7 marcado. Se asignaron los complementos inversos de dos sondas indicadas como 1364 y 1121 en la matriz GeneChip® Test3 de Affymetrix a los aptámeros 1472-3 y 6-7, y se sintetizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Se prepararon cuatro soluciones, cada una con una concentración de 2 nM de cada aptámero 1472-3 y 6-7, en plasma al 10 %, dando las siguientes concentraciones finales para los pares de proteínas (IL-1 R4, bFGF): (0, 0), (1 nM, 30 pM), (100 pM, 1 nM) y (10 pM, 100 pM). El diluyente de plasma contenía 0,9 x SB18, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque, 5 µg/ml de (BrdU)₃₀, Tween® 20 al 0,1 % y plasma al 10 %. Se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 minutos y se irradiaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se añadió 1 µl de 5 mg/ml de NHS-PEO₄-biotina en DMSO a cada muestra y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo que se añadieron 2 µl de glicina 100 mM (pH 7,5), 1 µl de SDS al 10 % y 5 µl de Triton X-100 al 10 %. Luego, se calentaron las muestras hasta 95 °C durante 10 minutos, se dejaron enfriar hasta la temperatura ambiente y se inactivaron con la adición de 10 µl de BSA al 10 % y 25 µl de NaCl 5 M. A continuación, se añadió 1 µl de 100 x sonda-108 como una secuencia de control.

Se bloquearon cuatro matrices Test3 durante 3 horas a 45 °C con la solución de leche en polvo desnatada descrita en el Ejemplo 11 para la matriz B. A continuación, se enjuagaron las matrices con PBS, SDS al 0,1 % y Triton X-100 al 0,4 %, y después se incubaron con 1 x SB17, BSA al 1 %, Triton X-100 al 0,5 %, SDS al 0,1 %, NaCl 1 M y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque durante 20 minutos a 45 °C. Después, se añadieron 100 µl de cada muestra a una matriz separada. Se incubaron las matrices a 45 °C durante 45 minutos. A continuación, se completó el ensayo como se ha descrito en el Ejemplo 12. Los resultados se presentan en la Fig. 16, donde se observan las respuestas de dosis lineales para ambas dianas en plasma.

Ejemplo 14. Detección de las proteínas diana complejo C5b,6, neurotropina-3 y troponina I mediante captura por hibridación de las proteínas fotorreticuladas en microesferas SeroMap™ de Luminex

El presente ejemplo demuestra el uso de microesferas SeroMap™ de Luminex como un soporte sólido para detectar y, opcionalmente, cuantificar una molécula diana que puede estar presente en una muestra de ensayo. Estos ensayos se realizaron con proteínas diana añadidas a tampón. El instrumento de detección fue un sistema instrumental Luminex 100 IS.

Se conjugaron las sondas con terminación amina asignadas a los fotoaptámeros 2184-64 (aptámero de complejo C5b,6), 2273-34 (aptámero de neurotropina-3) y 2338-12 (aptámero de troponina I) con microesferas SeroMap™ funcionalizadas con -COOH usando química de EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida).

Se hibridaron previamente los fotoaptámeros 2184-64, 2273-34 y 2338-12, a una concentración de ensayo final de 2 nM cada uno, con oligonucleótidos biotinilados complementarios a los extremos 3' de los aptámeros, luego se combinaron con una mezcla de las proteínas complejo C5b,6, neurotropina-3 y troponina I en un intervalo de concentraciones (169 fM a 3,33 nM) en tampón de SB17, Tween® 20 al 0,05 %. También se prepararon muestras de ensayo de control sin proteína por duplicado. Se incubaron estas muestras de ensayo, en volúmenes de 100 µl, a 37 °C durante 15 minutos y luego se fotorreticularon. Se añadieron perlas de estreptavidina Dynal MyOne (400 µg) a cada muestra de ensayo y se incubaron durante 10 minutos a 25 °C con mezclado para capturar el fotoaptámero:oligo biotinilado y los híbridos de proteínas-fotoaptámero:oligo biotinilado. Se lavaron las perlas 2 veces durante 30 segundos cada vez con 100 µl de bicarbonato de sodio 100 mM, EDTA 1 mM, Tween® al 0,02 % y

D-biotina 10 μ M (pH 8,5). El propósito del componente de D-biotina de este tampón era el de saturar los sitios de unión de estreptavidina libres. Se suspendieron las perlas lavadas en 100 μ l de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 8,5), EDTA 1 mM, Tween[®] 20 al 0,02 % y sulfo-NHS-LC-biotina 150 μ M (Pierce Biotechnology) con el fin de marcar el conjugado de proteína diana-fotoaptámero con biotina. Se incubó esta reacción de biotinilación a 25 °C durante 1 hora mezclando constantemente. A continuación, se lavaron las perlas 3 veces con 100 μ l de SB17, clorhidrato de guanidina 3,14 M, Tween[®] 20 al 0,05 % seguidas de 2 veces de lavado con 100 μ l de SB17, Triton X-100 al 0,33 %. Se suspendieron las perlas lavadas en 100 μ l de D-biotina 10 μ M, Tween[®] 20 al 0,05 %, HEPES 10 mM, pH 7,5 y después se calentaron hasta 70 °C durante 5 min para liberar los fotoaptámeros de sus oligonucleótidos biotinilados complementarios unidos a las perlas. Para cada muestra de ensayo, se combinaron 75 μ l del volumen eluido de las perlas con 25 μ l del siguiente tampón de alto contenido en sal: NaCl 4 M, Tween[®] 20 al 0,4 %, Tris-Cl 160 mM, pH 8,0. Se añadió SDS (11,25 μ l de 20 %) y se transfirió cada muestra de ensayo a una mezcla de 30 μ l de las microesferas SeroMap[™] conjugadas con la sonda apropiada (1.500 microesferas codificadas por color por sonda, Tween[®] 20 al 0,1 %, NaCl 1 M, BSA al 1,25 %, Tris-Cl 40 mM, pH 8,0). Para potenciar la hibridación de los fotoaptámeros a las microesferas conjugadas con las sondas, las muestras de ensayo se incubaron a 65 °C durante 2 horas mezclando de manera constante. A 65 °C, se transfirieron las muestras de ensayo a una placa de filtración al vacío de microtitulación de 96 pocillos, y se lavaron las microesferas 4 veces con NaCl 200 mM, Tween[®] 20 al 0,1 %, Tris-Cl 40 mM (pH 8,0) a 65 °C. A continuación, se suspendieron las microesferas en 80 μ l de NaCl 200 mM, Tween[®] 20 al 0,1 %, Tris-Cl 40 mM (pH 8,0) y se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron 20 μ l de 10 μ g/ml de estreptavidina-R-ficoeritrina (Molecular Probes # S866) para permitir la detección de las proteínas diana biotiniladas reticuladas con fotoaptámero. Tras una incubación de 15 minutos a 37 °C, se sometieron las muestras de ensayo a un protocolo de cuantificación de señales con instrumento Luminex convencional (R-ficoeritrina).

La Fig. 17 representa gráficamente los resultados para el fotoaptámero de complejo C5b,6 2184-64 (Fig. 17A), fotoaptámero de neurotropina-3 2273-34 (Fig. 17B) y fotoaptámero de troponina I 2338-12 (Fig. 17C). Los valores de IFM (intensidad de fluorescencia media) se han corregido restando el valor de IMF del control sin proteína para cada aptámero.

La información anterior describe la invención con referencia a diversas realizaciones y ejemplos. Ninguna realización, ejemplo o elemento en particular de una determinada realización o ejemplo se ha de interpretar como un elemento o una característica crítica, necesaria o esencial de ninguna de las reivindicaciones. Además, no se requiere ningún elemento descrito en el presente documento para la práctica de la invención a menos que se describa expresamente como "esencial" o "crítico".

Se apreciará que es posible realizar diversas modificaciones y sustituciones en las realizaciones desveladas sin apartarse del alcance de la invención como se establece en las reivindicaciones que se presentan a continuación. La memoria descriptiva, incluyendo las figuras y los ejemplos, se ha de considerar de una manera ilustrativa, en lugar de restrictiva, y la totalidad de dichas modificaciones y sustituciones pretende estar incluida dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, el alcance de la invención debe estar determinado por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales, en lugar de por los ejemplos proporcionados anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de una molécula diana que puede estar presente en una muestra de ensayo, comprendiendo el método:
 - (a) poner en contacto una muestra de ensayo con un aptámero que tiene una afinidad específica por la molécula diana, formándose un complejo de afinidad de aptámero mediante la interacción de un aptámero con su molécula diana, si dicha molécula diana está presente en dicha muestra de ensayo, en donde un complejo de afinidad de aptámero es un complejo no covalente formado por la interacción de un aptámero con su molécula diana;
 - (b) tras la formación del complejo de afinidad de aptámero de la etapa (a), introducir una molécula competidora en la muestra de ensayo y/o capturar el complejo de afinidad de aptámero sobre un soporte sólido, seguido del lavado posterior con una solución con una molécula competidora presente en la solución, seleccionándose la molécula competidora entre un oligonucleótido, un polianión, un polidextrano o varios dNTP; y
 - (c) detectar y/o cuantificar el aptámero del complejo de afinidad de aptámero o el complejo de afinidad de aptámero separado del resto de la muestra de ensayo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho competidor es un polianión.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el polianión es sulfato de dextrano.
4. El método de la reivindicación 2, en el que dicho polianión es heparina o polidextrano.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho aptámero es un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicho aptámero es ADN o ARN.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha molécula diana se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un hidrato de carbono, un polisacárido, una glucoproteína, una hormona, un receptor, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un sustrato, un metabolito, un cofactor, un inhibidor, un fármaco, un colorante, un nutriente, un factor de crecimiento y un tejido.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha molécula diana es una proteína.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha proteína es una glucoproteína.
10. El método de la reivindicación 8, en el que dicha proteína es un receptor o un anticuerpo.
11. El método de la reivindicación 7, en el que dicha molécula diana es un hidrato de carbono.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho hidrato de carbono es un polisacárido.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en sangre entera, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aliento, orina, semen, saliva, líquido meníngeo, líquido amniótico, líquido glandular, líquido linfático, aspirado de líquido del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, células, un extracto celular, heces, tejido, una biopsia tisular y líquido cefalorraquídeo.
14. El método de la reivindicación 13, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra biológica de células.
15. El método de la reivindicación 14, en el que dichas células son leucocitos o células mononucleares de sangre periférica.

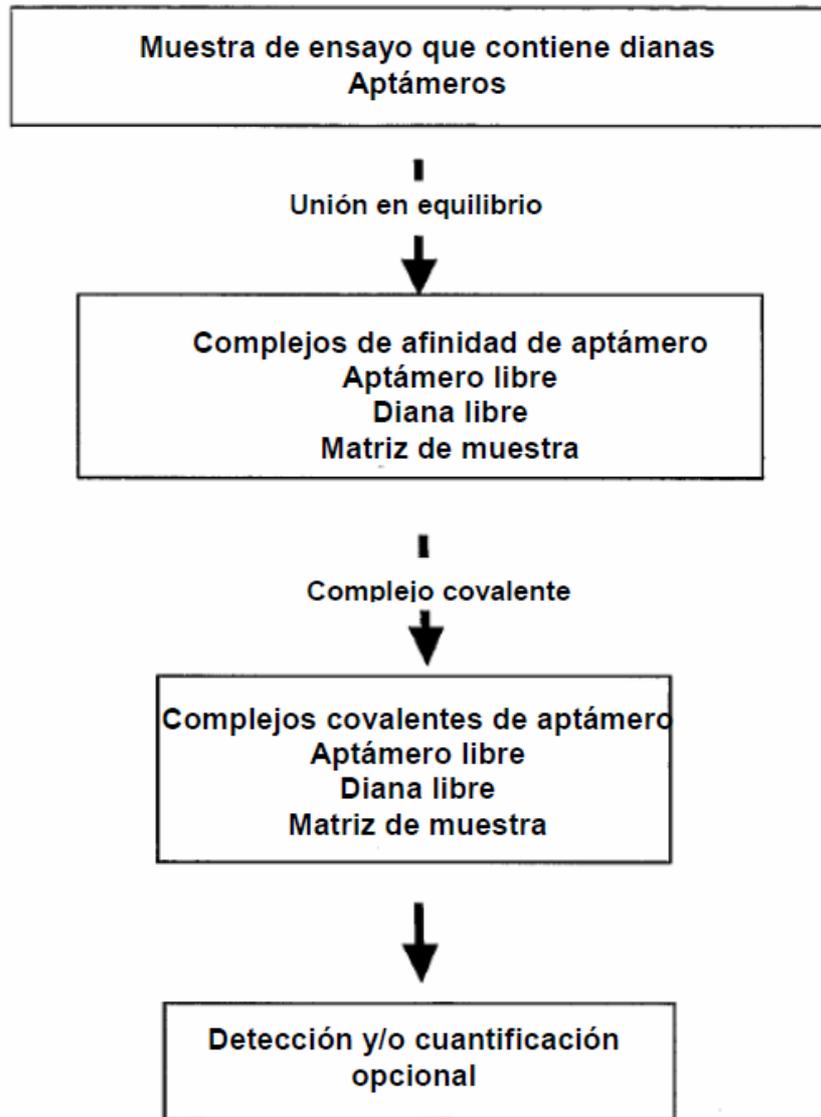


FIG. 1A

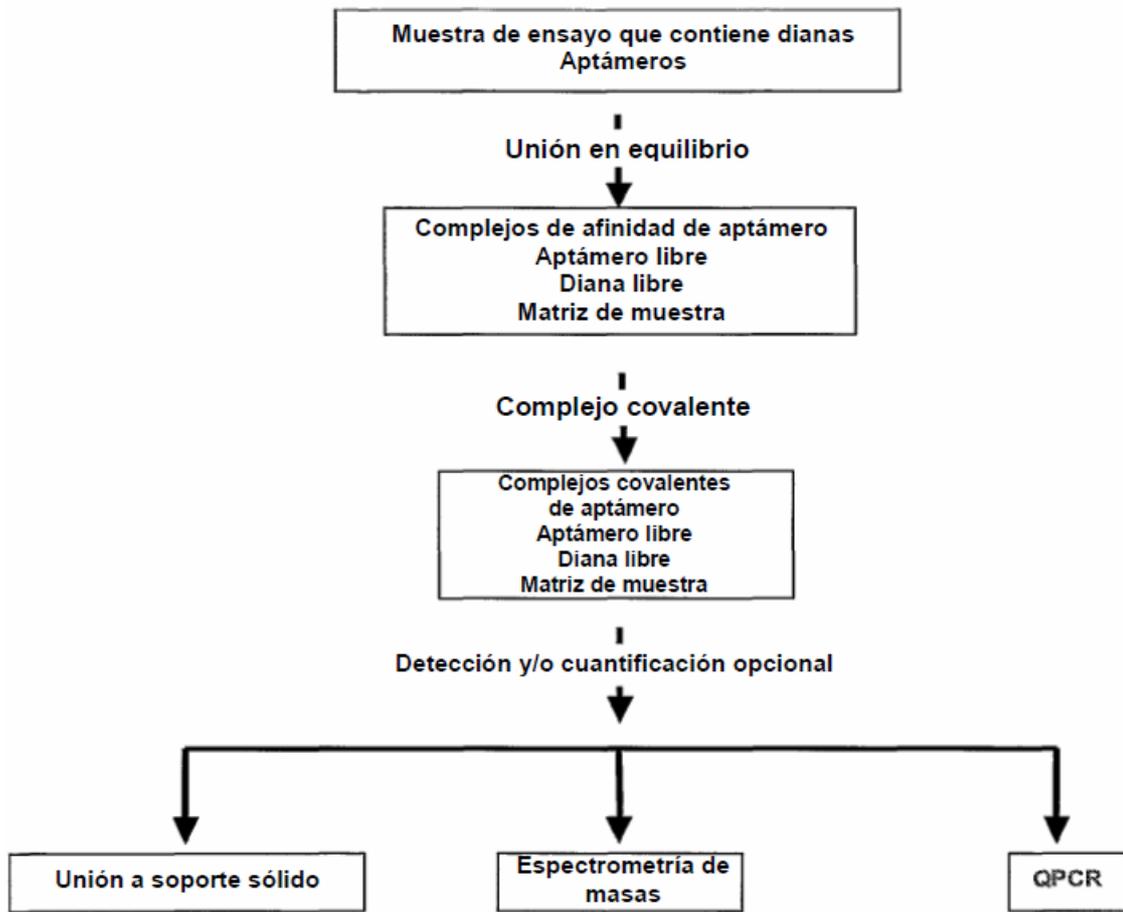


FIG. 1B

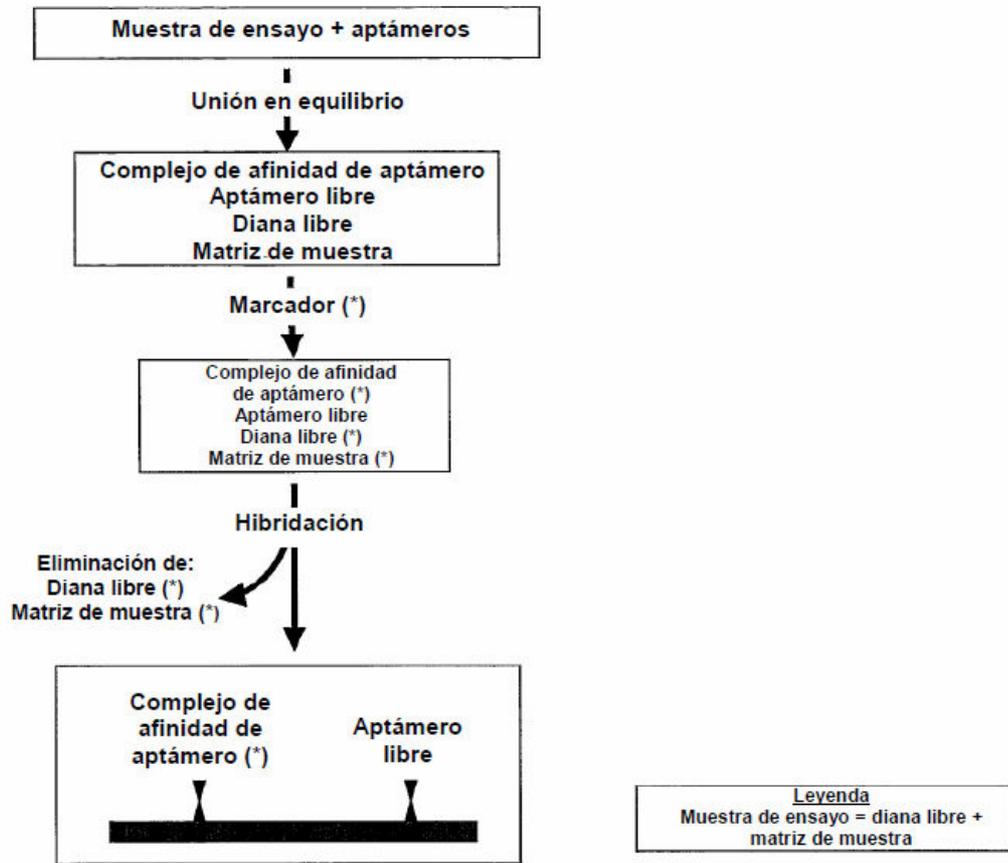


FIG. 2A

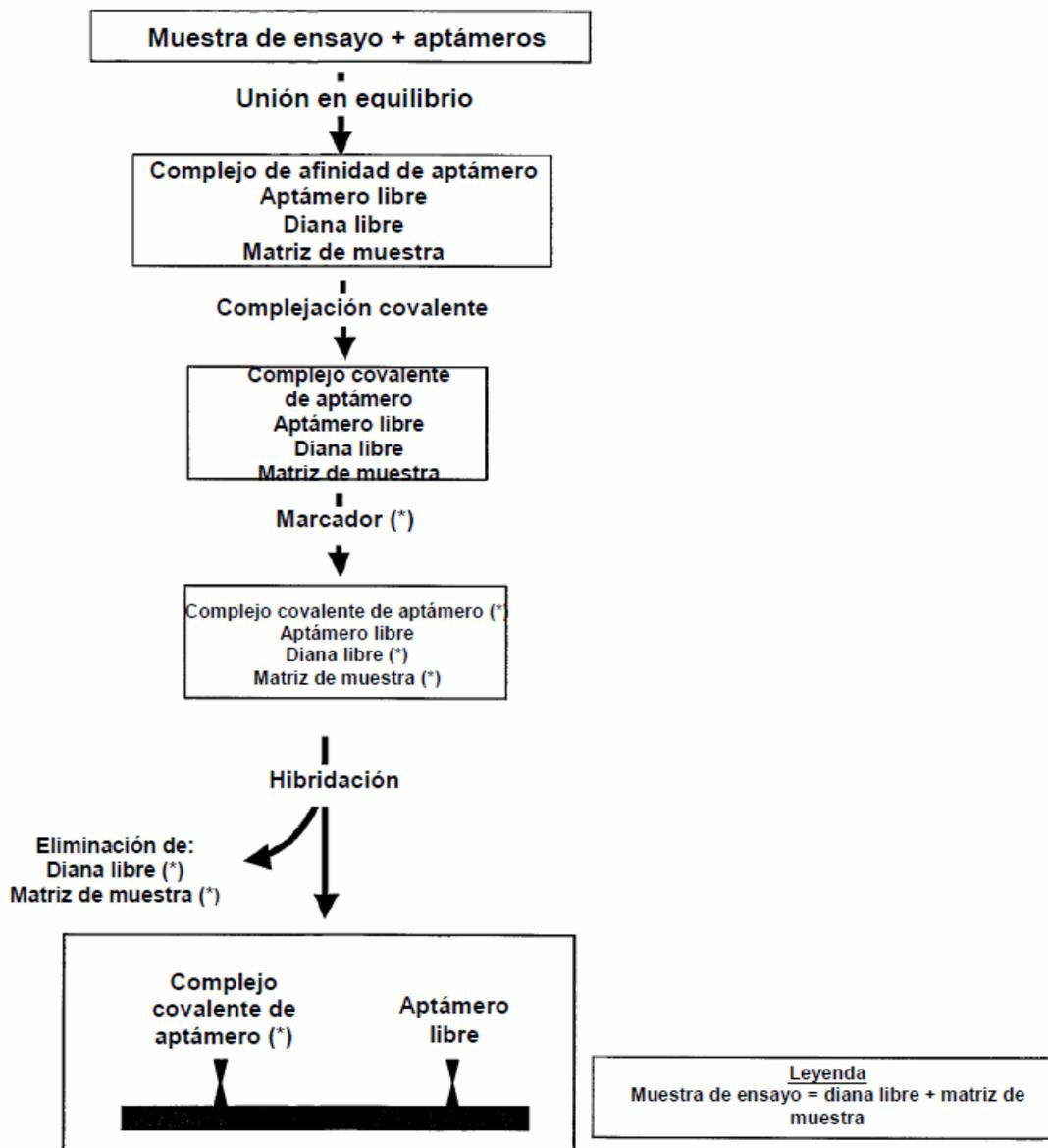


FIG. 2B

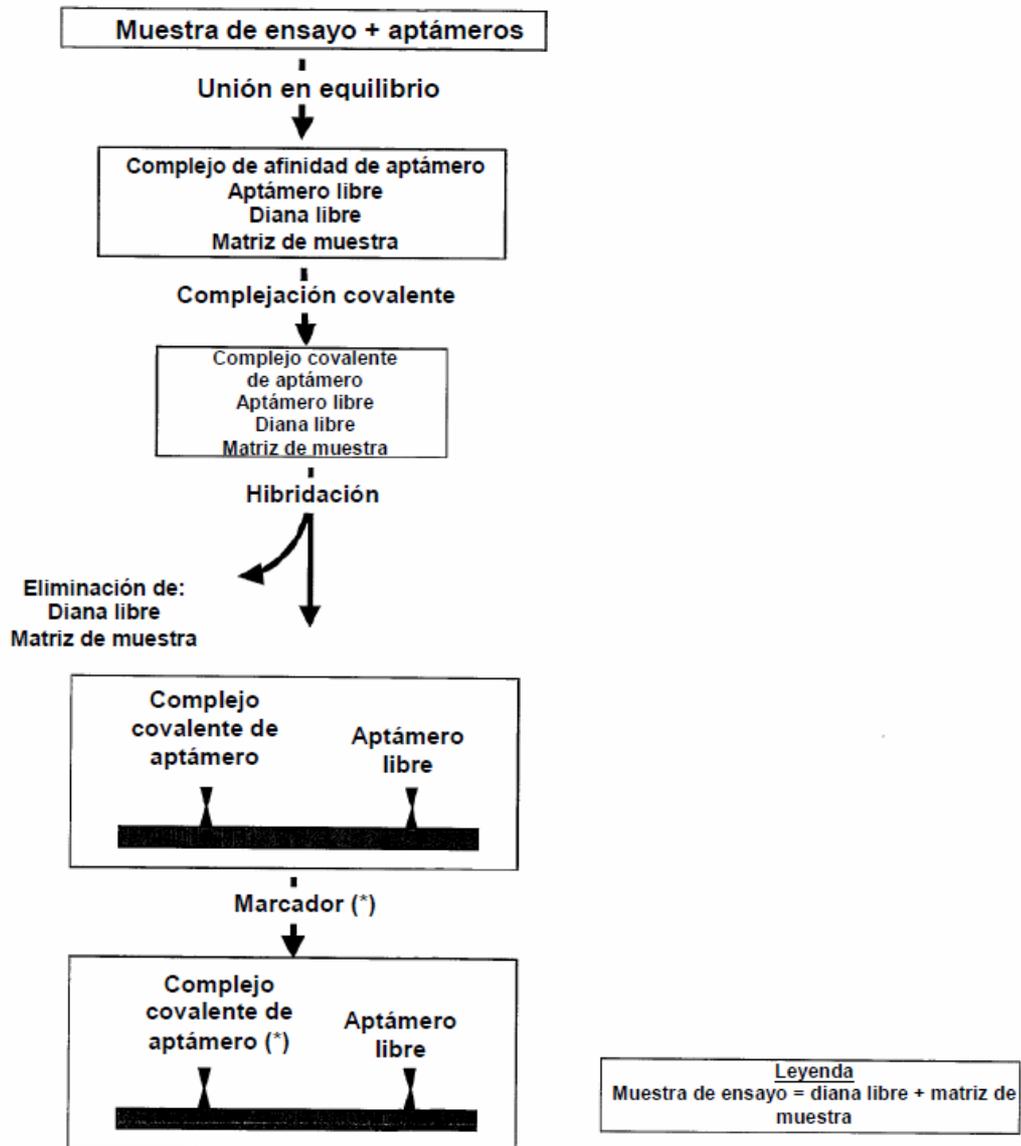


FIG. 2C

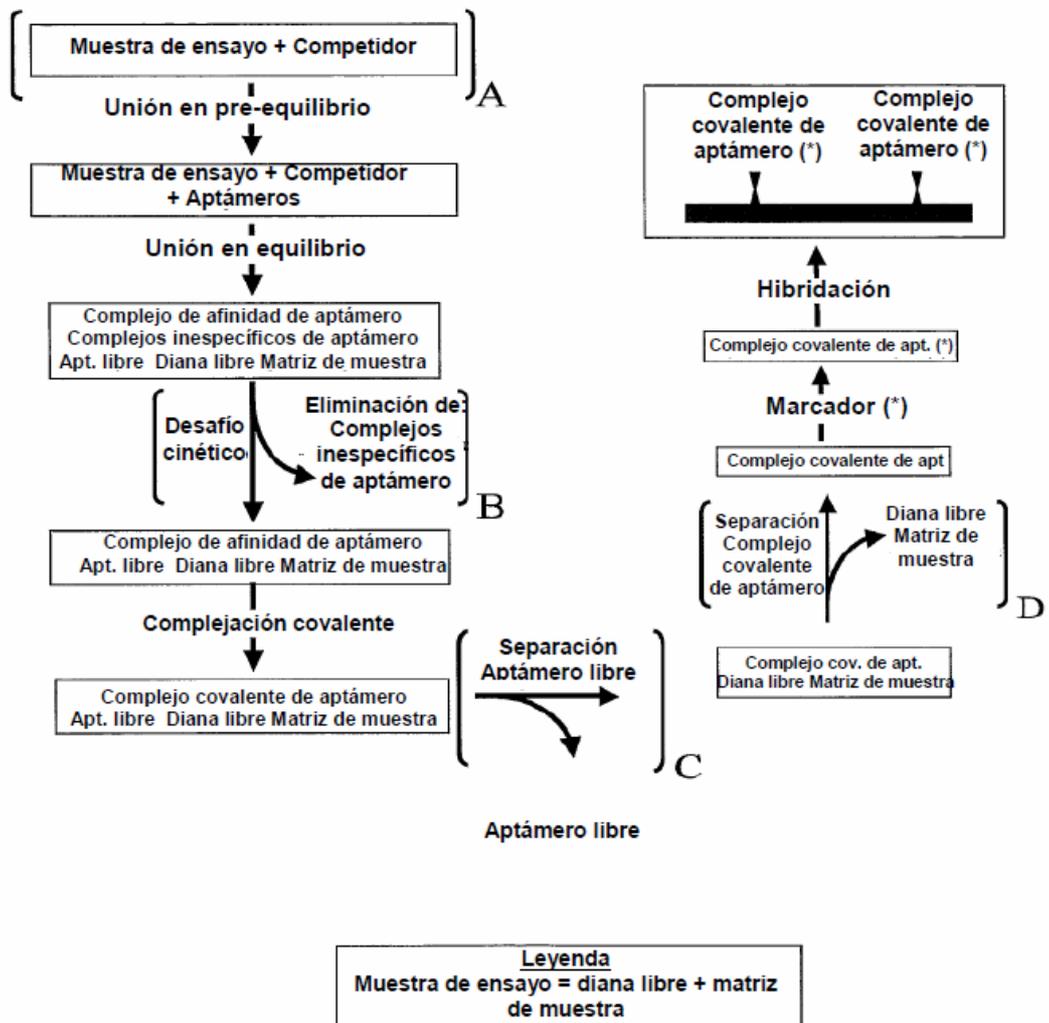


FIG. 3

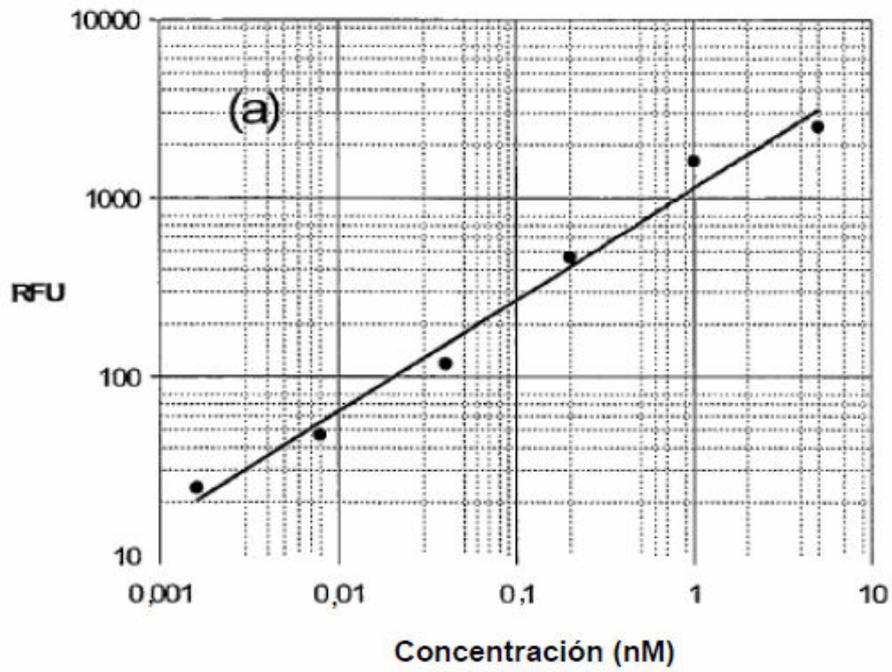


FIG. 4A

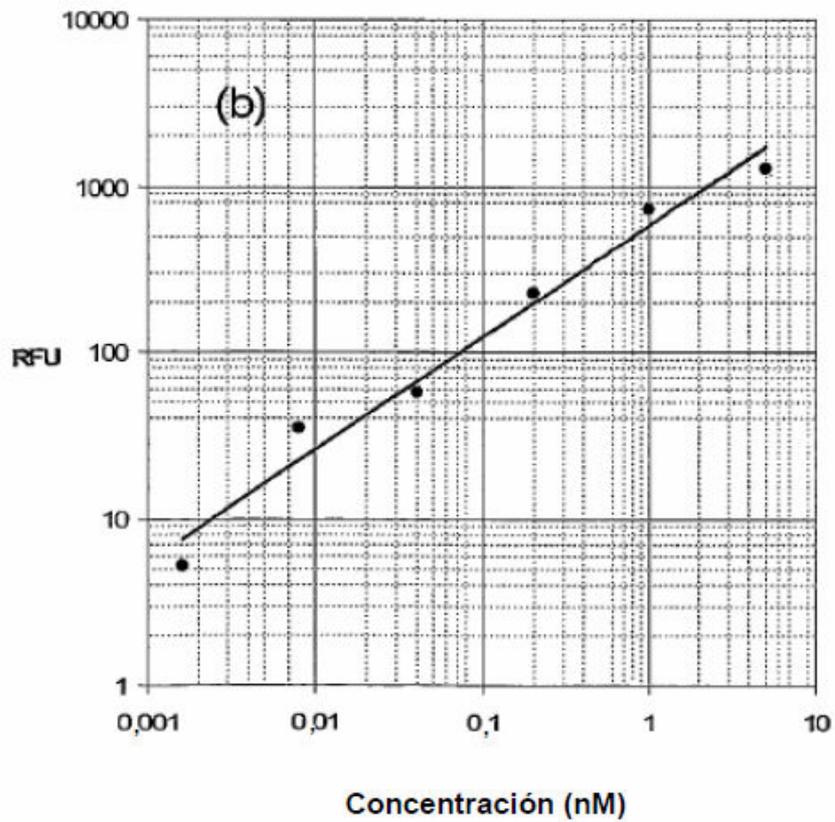


FIG. 4B

FIG. 5A

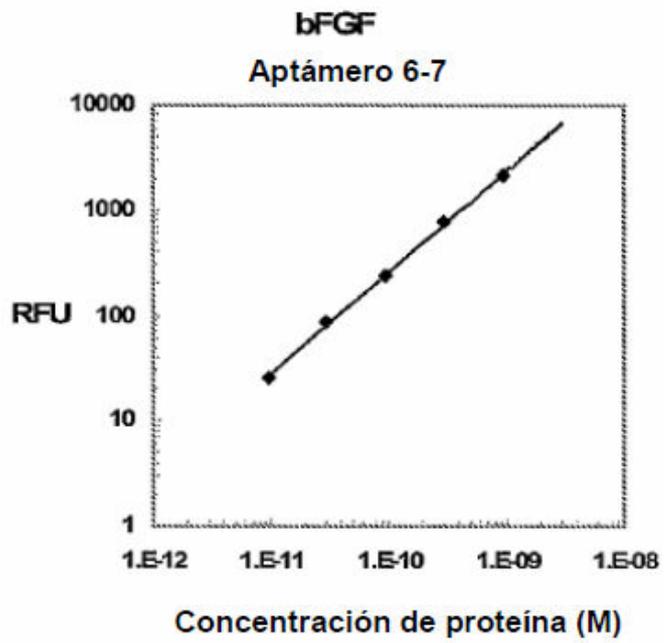


FIG.5B

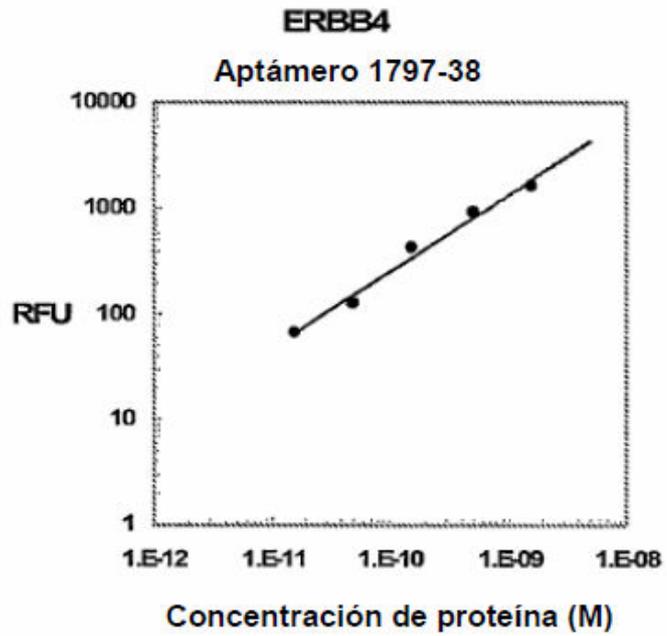


FIG. 5C

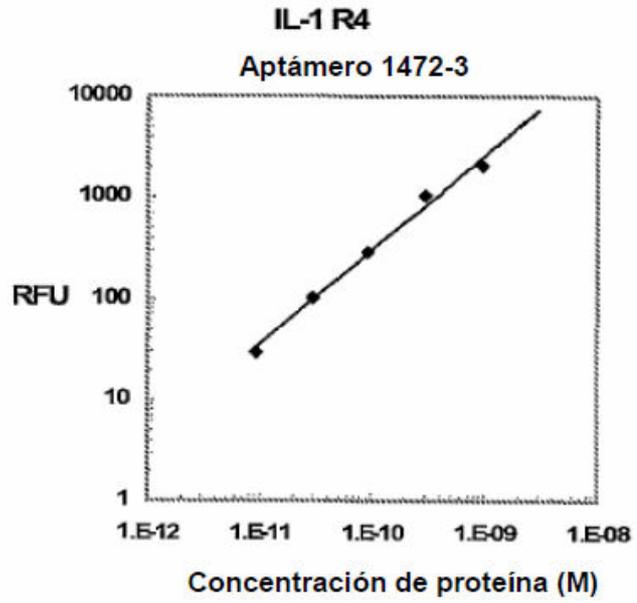


FIG. 5D

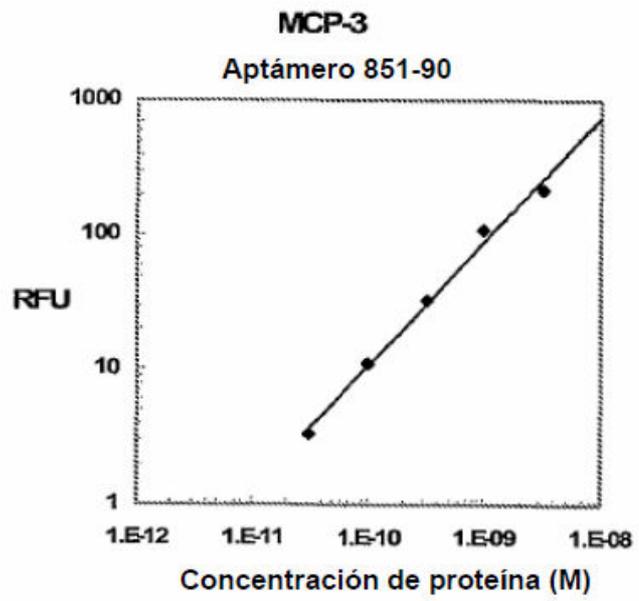


FIG.5E

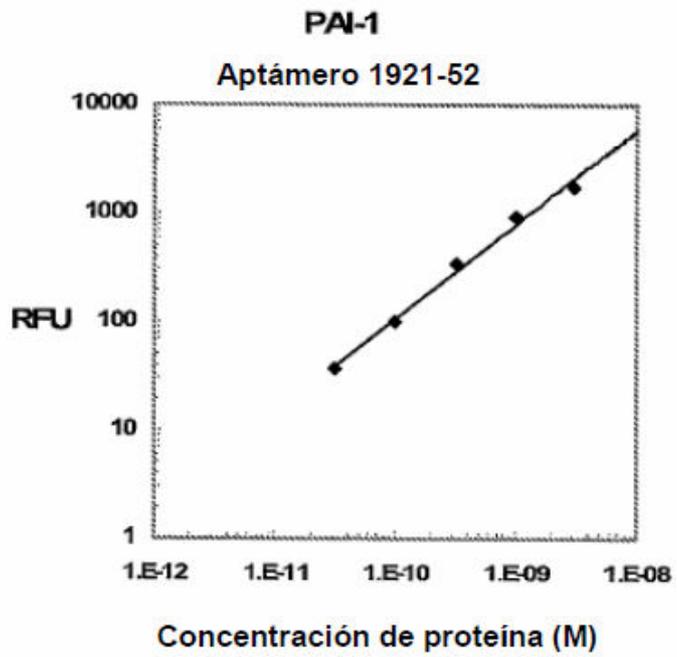


FIG. 5F

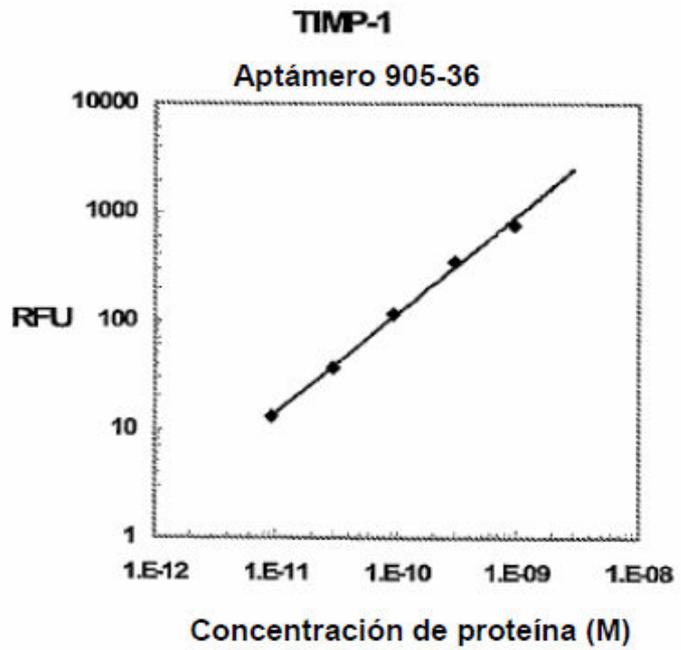


FIG. 5G

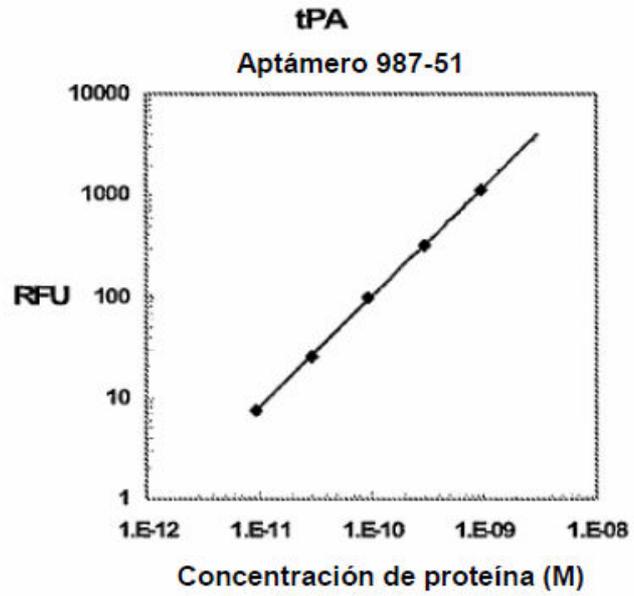


FIG.5H

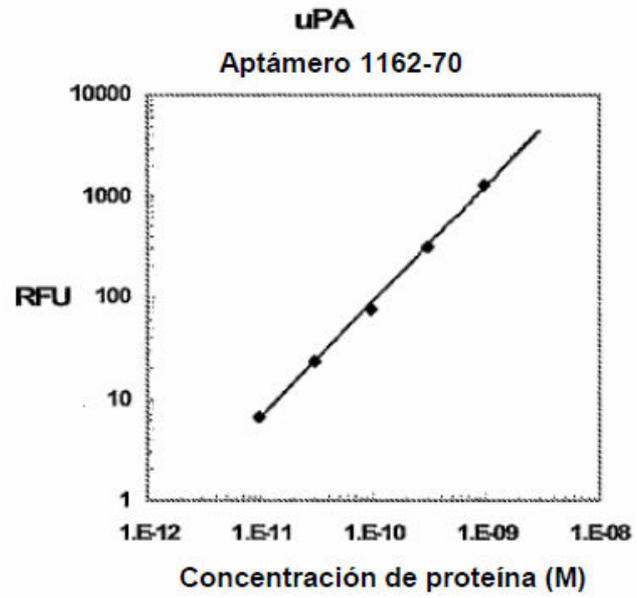


FIG. 5I

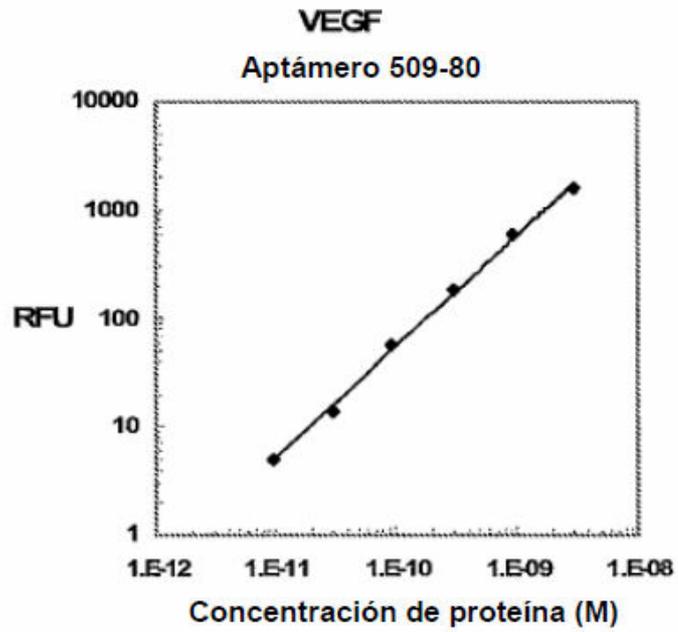
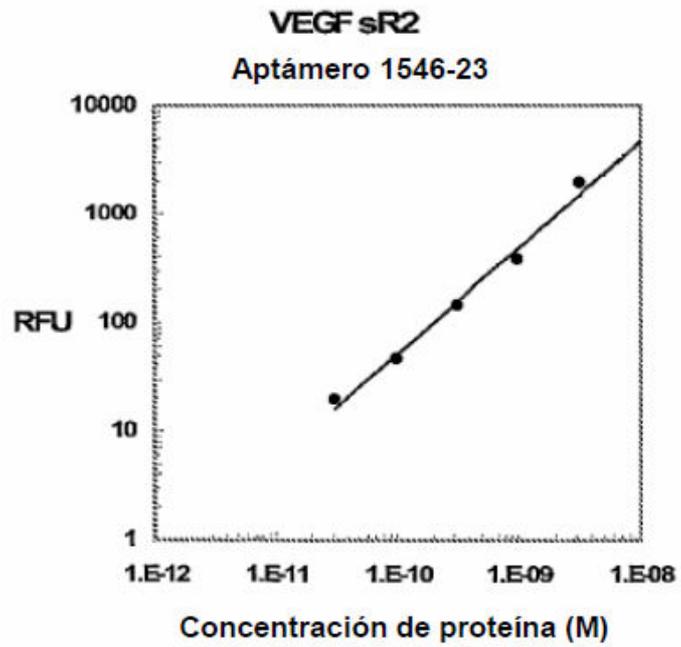


FIG. 5J



Medidas repetidas en la serie
57 aptámeros en 2 matrices

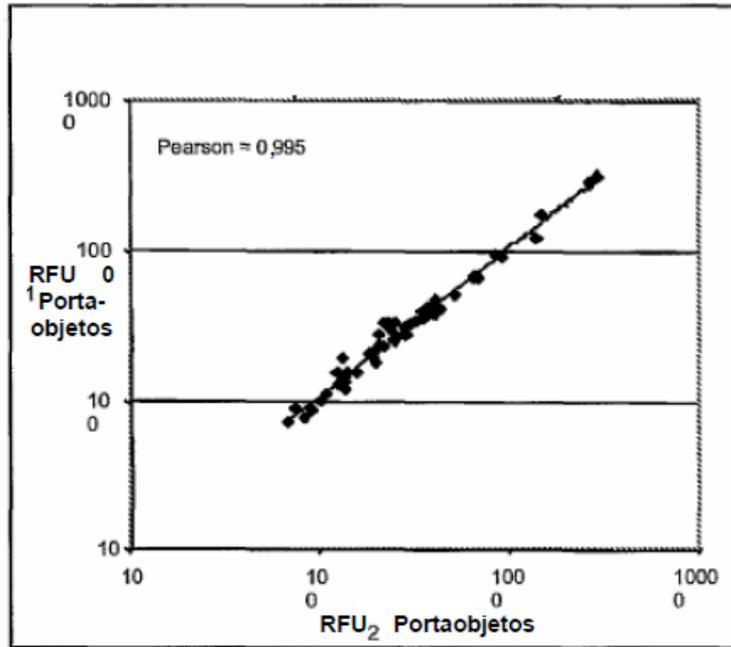


FIG. 6A

Medidas repetidas en la serie
57 aptámeros en 2 matrices

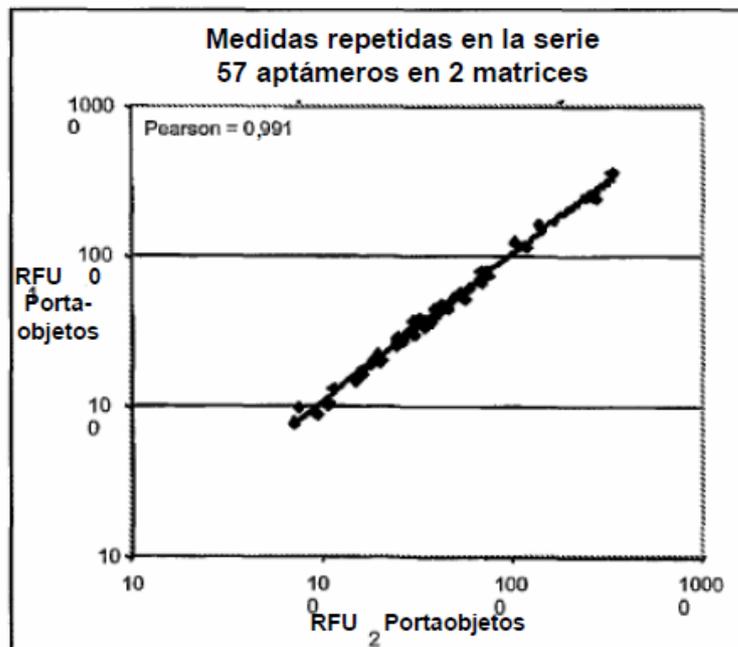


FIG. 6B

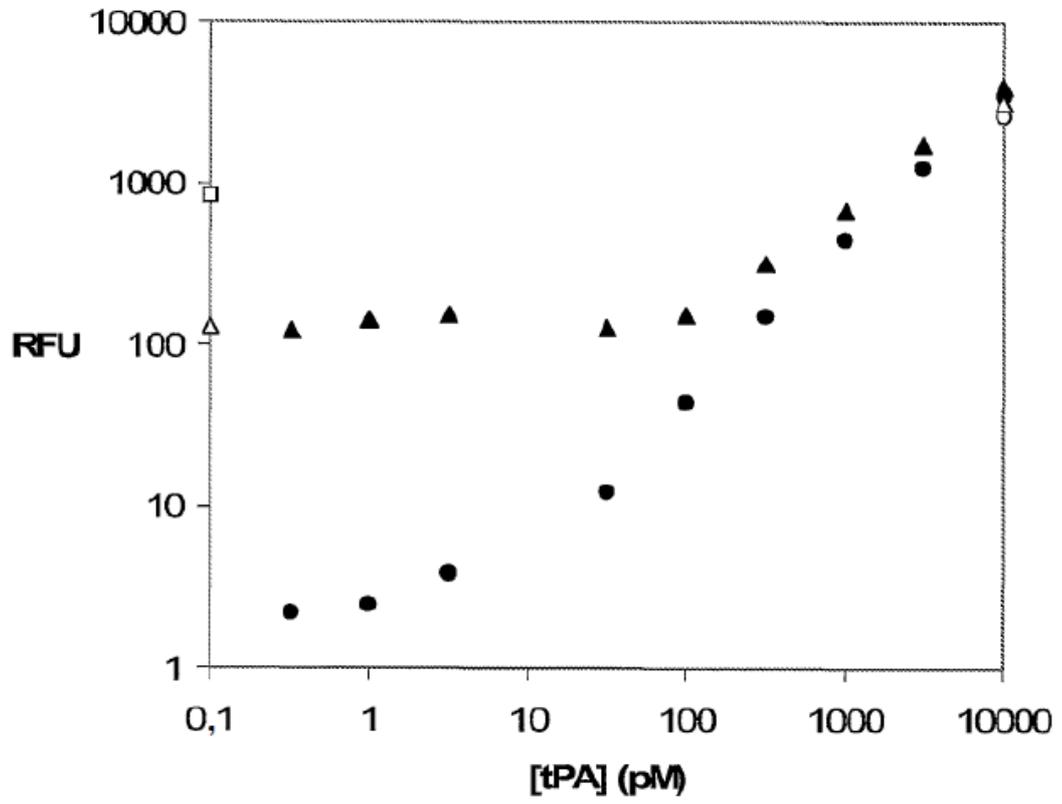


FIG. 7

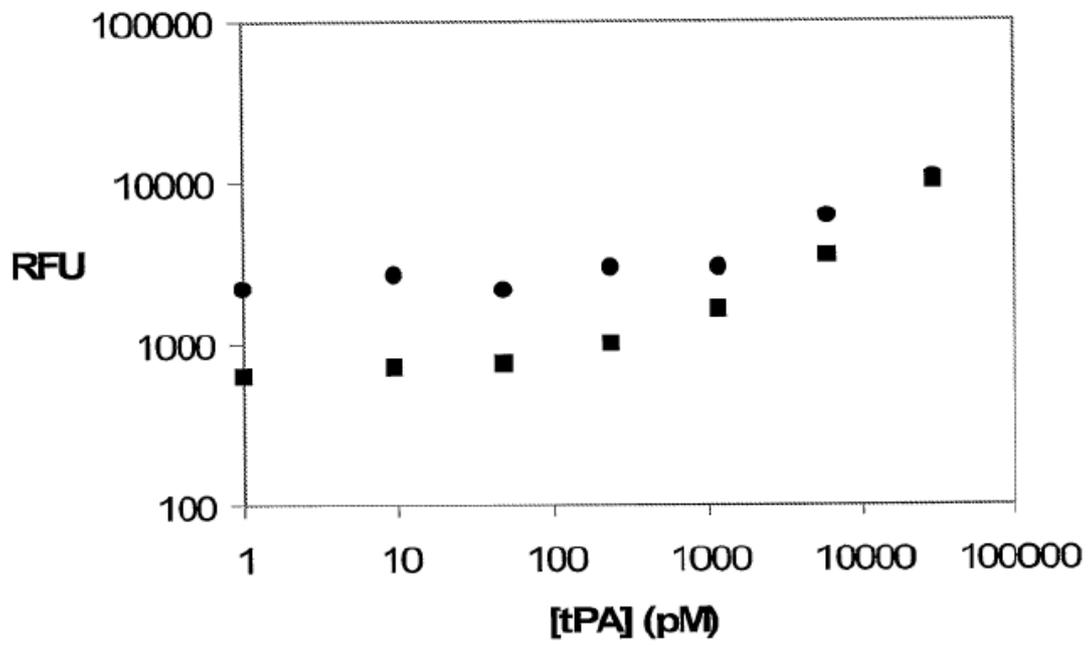


FIG. 8

FIG. 9A

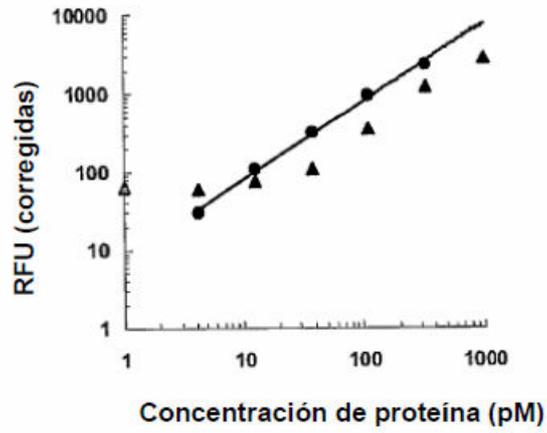


FIG. 9B

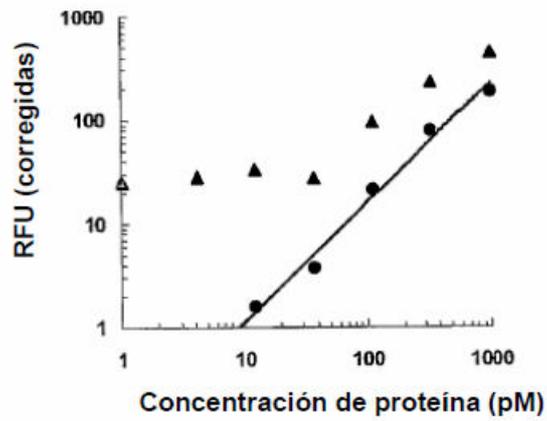


FIG. 9C

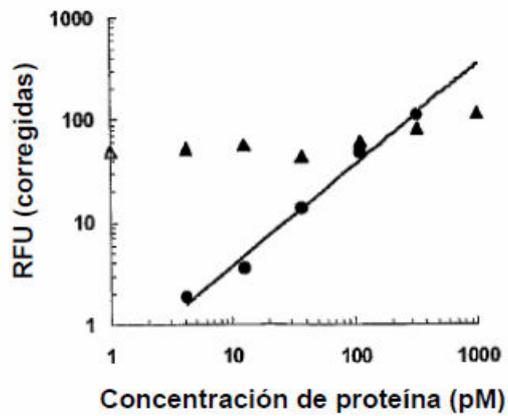


FIG. 10A

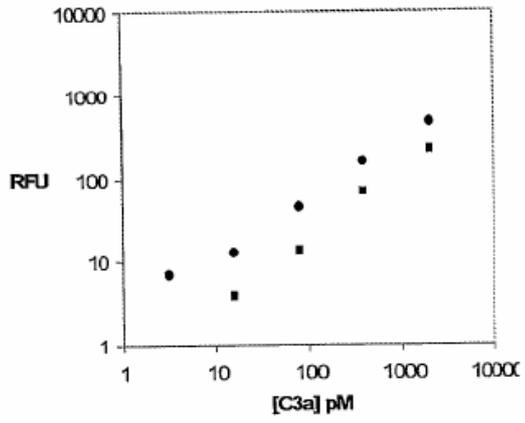


FIG. 10B

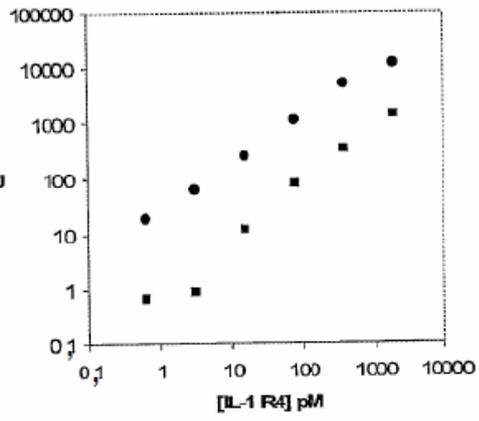
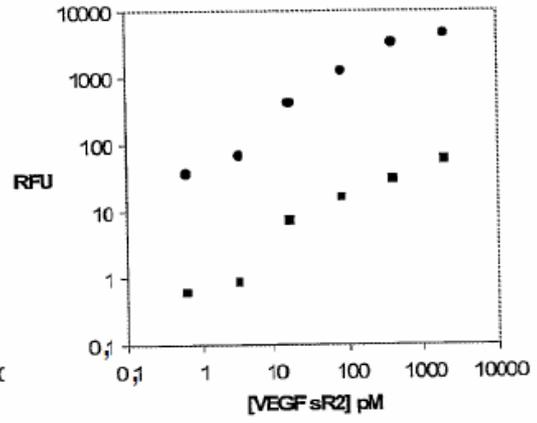


FIG. 10C

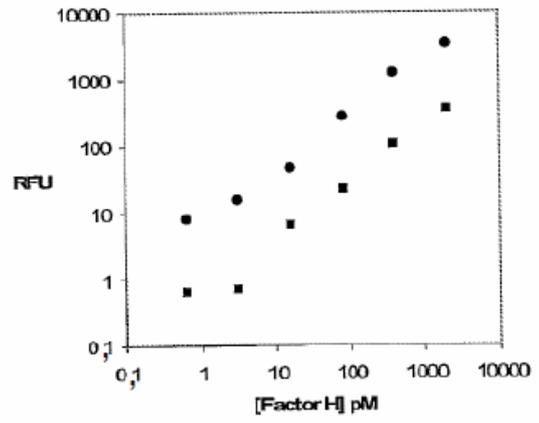


FIG. 10D

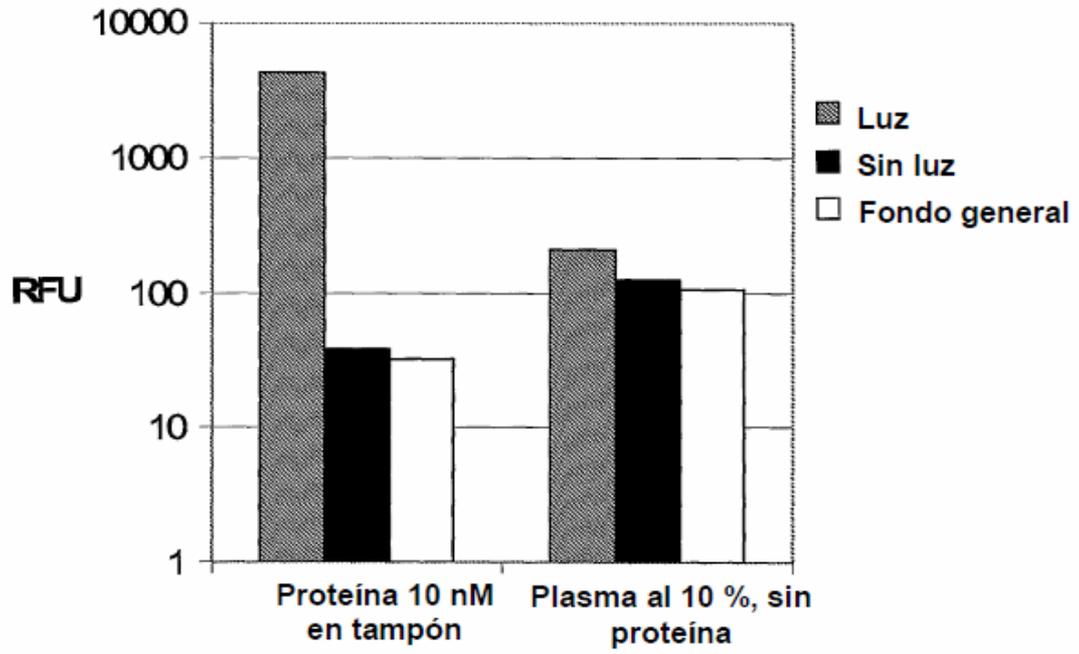


FIG. 11

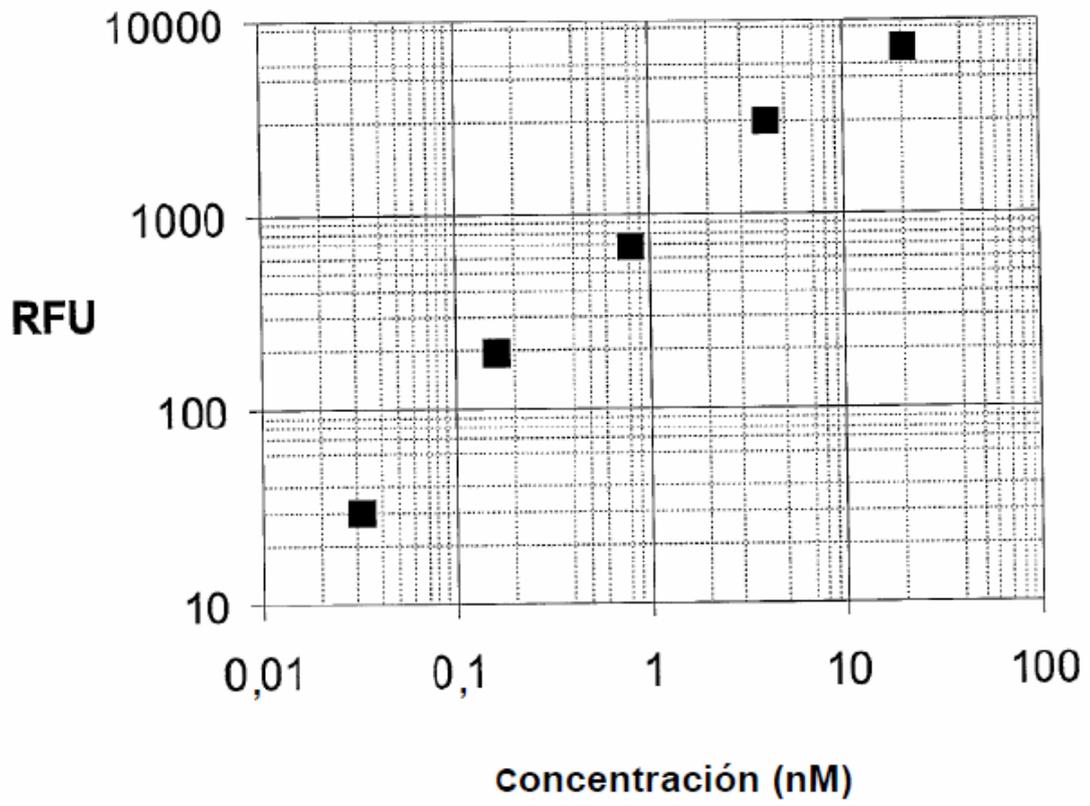


FIG. 12

FIG. 13A

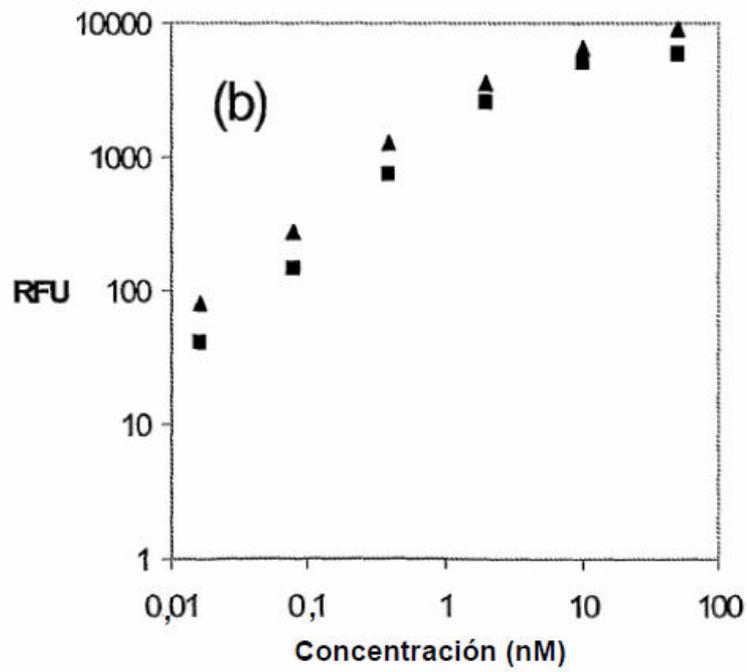
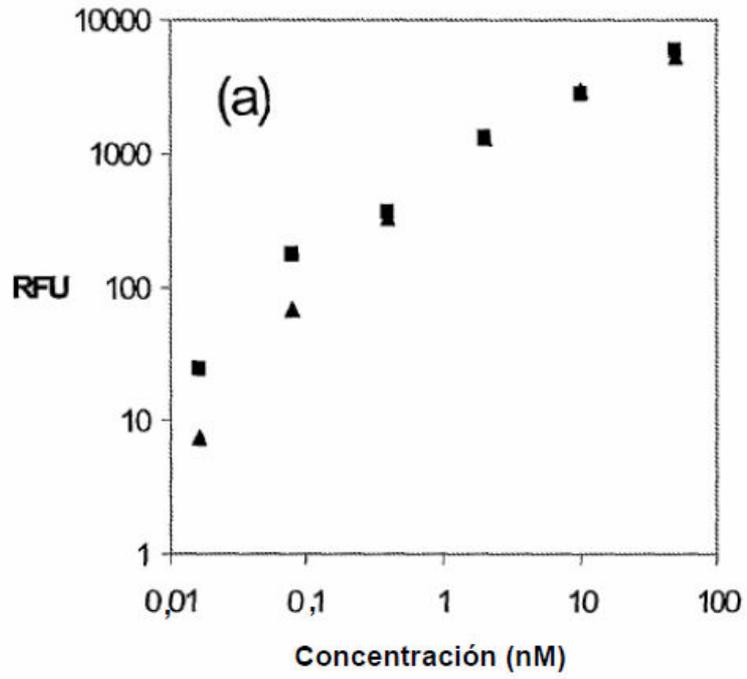


FIG. 13B

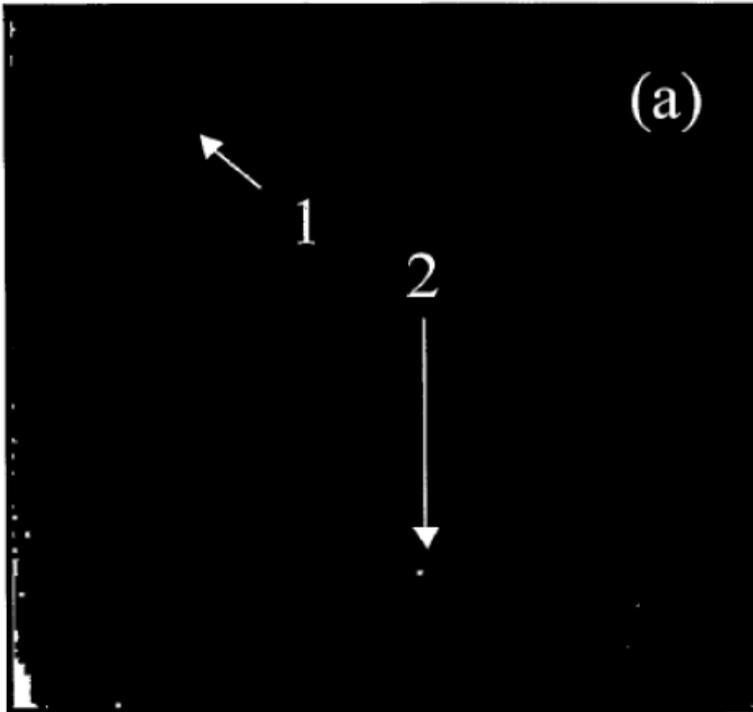


FIG. 14A

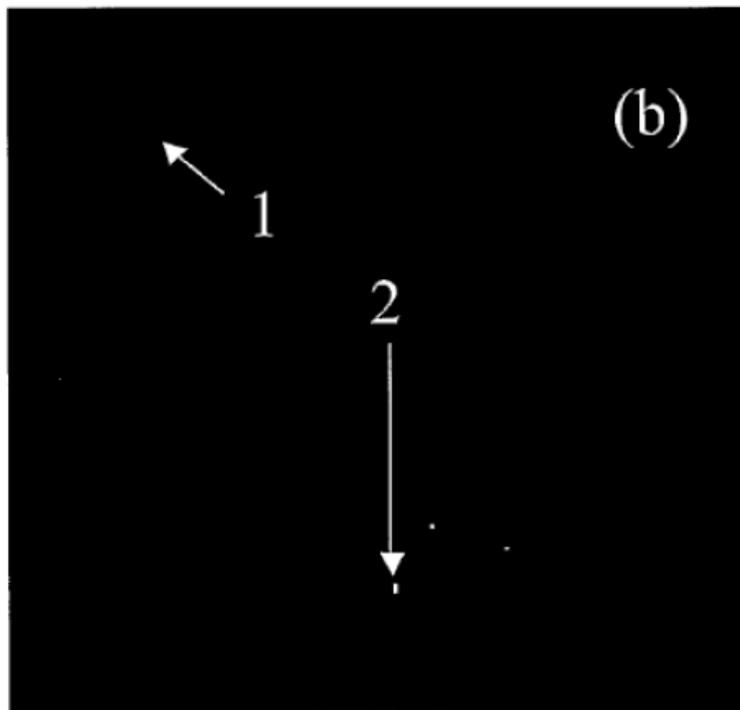


FIG. 14B

FIG. 15A

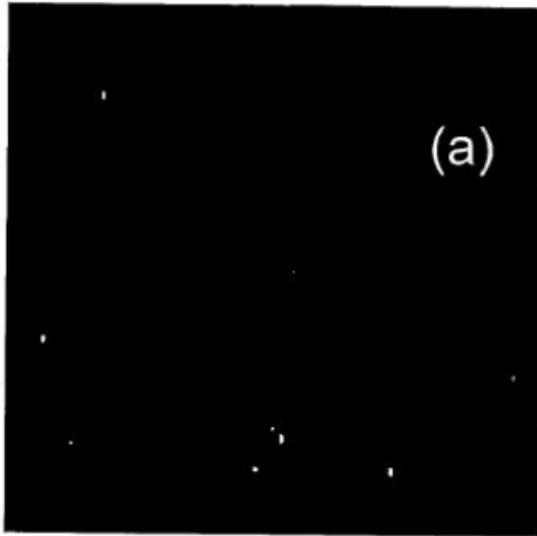


FIG. 15B

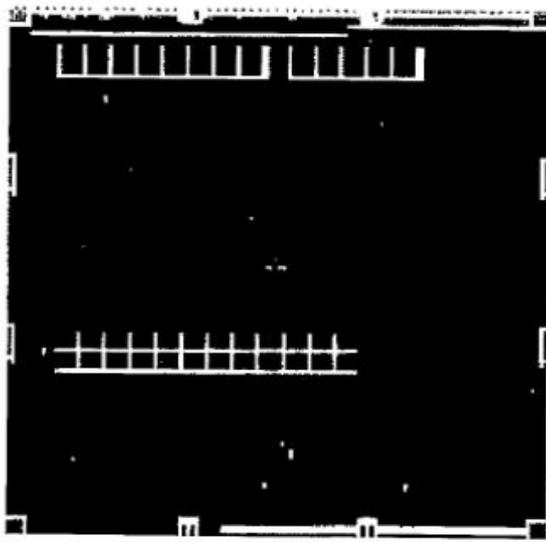
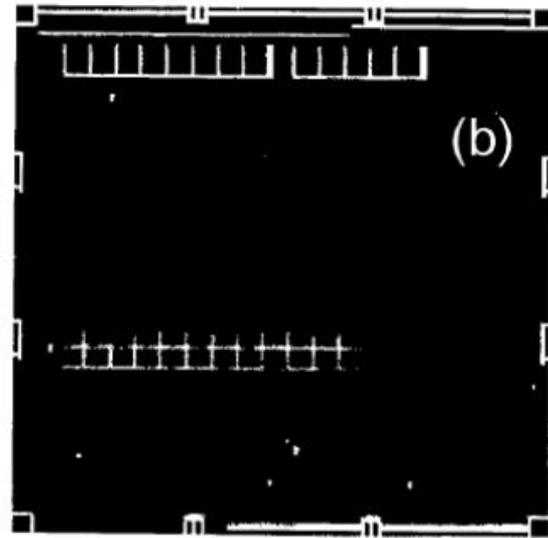


FIG. 15C

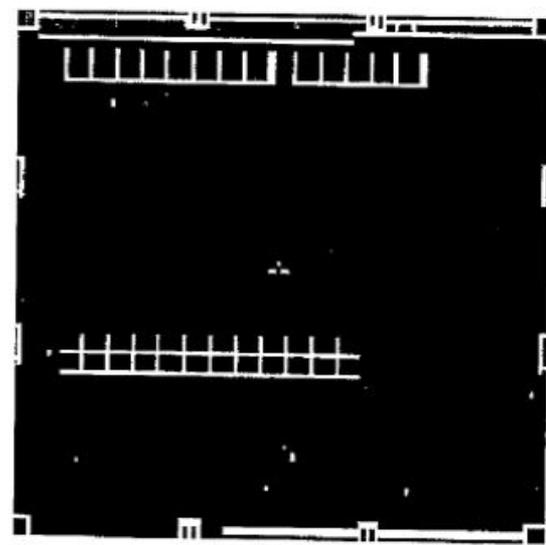


FIG. 15D

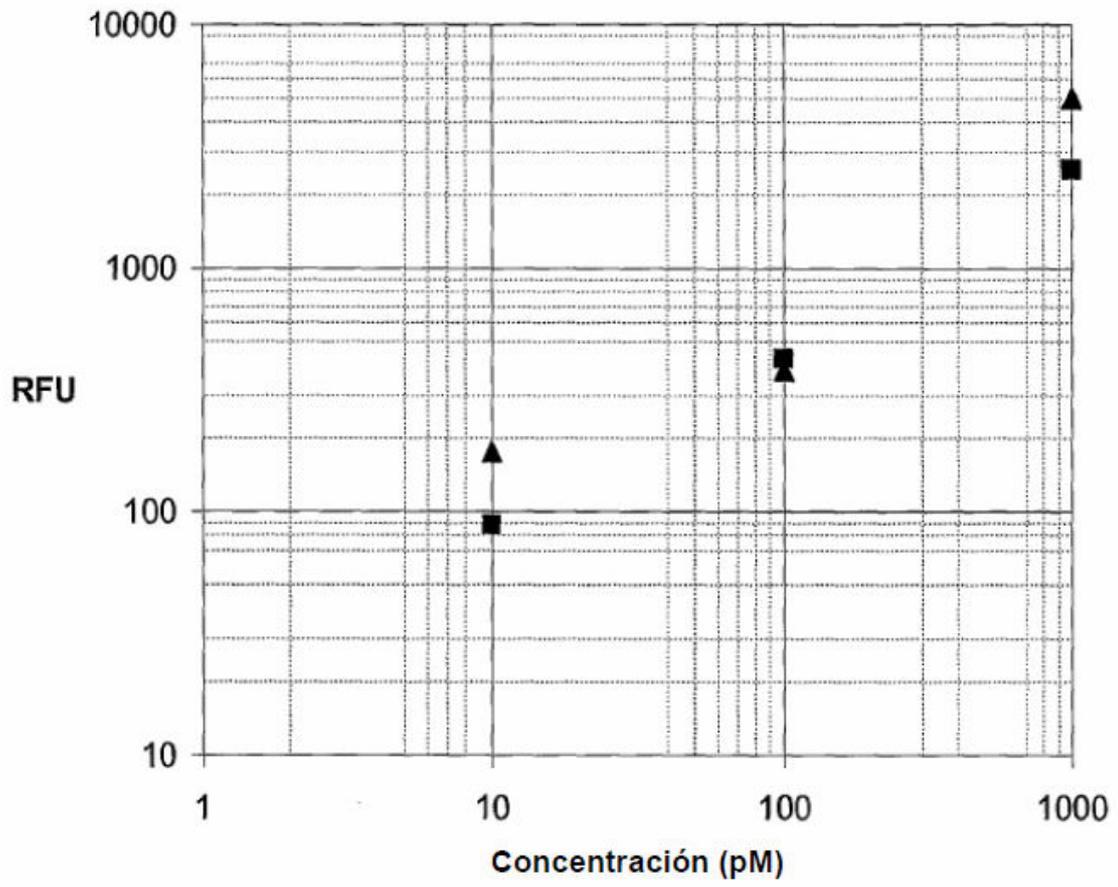


FIG. 16

FIG. 17A

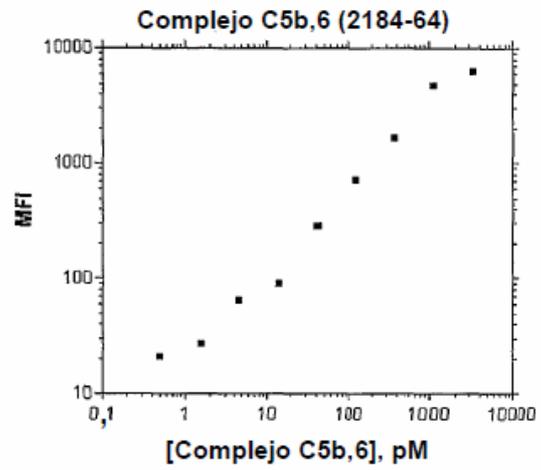


FIG. 17B

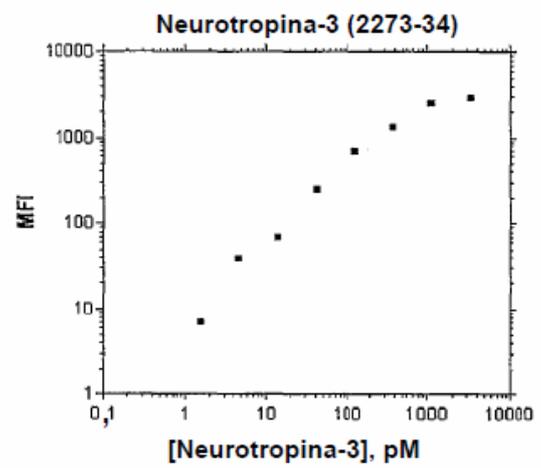


FIG. 17C

