

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 764**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2008** **PCT/US2008/070386**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2009** **WO09012420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2008** **E 08782013 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 2076613**

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

30 Prioridad:

17.07.2007 US 950293 P

17.07.2007 US 950283 P

17.07.2007 US 950281 P

26.02.2008 US 31420 P

08.05.2008 US 51594 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2017

73 Titular/es:

SOMALOGIC, INC. (100.0%)

2945 WILDERNESS PLACE

BOULDER, CO 80301, US

72 Inventor/es:

SCHNEIDER, DANIEL J.;

NIEUWLANDT, DAN;

EATON, BRUCE;

STANTON, MARTY;

GUPTA, SHASHI;

KRAEMER, STEPHAN;

ZICHI, DOMINIC y

GOLD, LARRY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 604 764 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 de muestras de ensayo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a métodos, dispositivos, reactivos y kits para la detección de una molécula diana en una muestra y, más específicamente, a la detección y/o la cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar contenidas en una muestra de ensayo. Tales métodos tienen una amplia utilidad en aplicaciones de diagnóstico, además de en el descubrimiento de biomarcadores y el diseño y el desarrollo de terapéuticos.

Antecedentes

La siguiente descripción proporciona un resumen de información relevante para la presente divulgación y no es una concesión de que cualquiera de la información proporcionada o las publicaciones citadas en el presente documento sea estado de la técnica para la invención presentemente reivindicada.

Los ensayos dirigidos a la detección y la cuantificación de moléculas fisiológicamente significativas en muestras biológicas y otras muestras son herramientas importantes en la investigación científica y en el campo sanitario. Una clase de tales ensayos implica el uso de una micromatriz que incluye uno o más aptámeros inmovilizados sobre un soporte sólido. Los aptámeros son cada uno capaces de unirse a una molécula diana de una manera altamente específica y con afinidad muy alta. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands"; véase, por tanto, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.242.246, la patente de EE.UU. N.º 6.458.543 y la patente de EE.UU. N.º 6.503.715, cada una de las cuales se titula "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip". Una vez la micromatriz se pone en contacto con una muestra, los aptámeros se unen a sus moléculas diana respectivas presentes en la muestra y así permiten una determinación de la ausencia, presencia, cantidad y/o concentración de las moléculas diana en la muestra.

Una variación de este ensayo emplea aptámeros que incluyen grupos funcionales fotorreactivos que permiten que los aptámeros se unan covalentemente o "fotorreticulen" sus moléculas diana. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.544.776 titulada "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip". Estos aptámeros fotorreactivos también se denominan fotoaptámeros. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.763.177, la patente de EE.UU. N.º 6.001.577 y la patente de EE.UU. N.º 6.291.184, cada una de las cuales se titula "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"; véase, por tanto, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands". Después de que la micromatriz se ponga en contacto con la muestra y los fotoaptámeros hayan tenido la oportunidad de unirse a sus moléculas diana, los fotoaptámeros se fotoactivan, y el soporte sólido se lava para eliminar cualquier molécula no específicamente unida. Pueden usarse condiciones de lavado agresivas, ya que las moléculas diana que están unidas a los fotoaptámeros no se eliminan generalmente, debido a los enlaces covalentes creados por el (los) grupo(s) funcional(es) fotoactivado(s) en los fotoaptámeros. De este modo, el ensayo permite una determinación de la ausencia, presencia, cantidad y/o concentración de las moléculas diana en la muestra de ensayo.

En ambos de estos formatos de ensayo, los aptámeros se inmovilizan sobre el soporte sólido antes de ponerse 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 pre-inmovilización de los aptámeros puede producir una mezcla ineficiente de los aptámeros con las moléculas diana sobre la superficie del soporte sólido, conduciendo quizás a tiempos de reacción largos y, por tanto, periodos de incubación prolongados para permitir la eficiente unión 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 enlaces covalentes entre los fotoaptámeros y sus moléculas diana. Además, dependiendo del método empleado, la detección de moléculas diana unidas a sus aptámeros puede estar sujeta a imprecisión, ya que la superficie del soporte sólido también puede estar expuesta a y ser afectada por cualquier agente de marcado que se use. Finalmente, la inmovilización de los aptámeros sobre el soporte sólido generalmente implica una etapa de preparación de aptámeros (es decir, la inmovilización) antes de la exposición de los aptámeros a la muestra, y esta etapa de preparación puede afectar la actividad o funcionalidad de los aptámeros. El documento US2003/0219801 desvela métodos de identificación de moléculas diana en una muestra biológica mediante el uso de aptámeros diseñados para unirse a moléculas diana específicas e hibridando una subsecuencia de ácido nucleico del aptámero con una matriz de ácido nucleico.

Por consiguiente, existe la necesidad de métodos, dispositivos, reactivos y kits que proporcionen ensayos de alta sensibilidad para la detección y/o cuantificación de moléculas diana en una muestra de ensayo optimizando las condiciones que afectan a uno o más de los siguientes: (1) la actividad de aptámeros, (2) la eficiencia de lograr equilibrios de unión para complejos aptámero-molécula diana, (3) la formación de enlace(s) covalente(s) entre un aptámero y su molécula diana, (4) la eliminación de componentes de muestras externos y el exceso de aptámeros,

- (5) disociación del complejo de afinidad formado mediante el uso de aptámero de constante de disociación lenta, y
 (6) la detección de complejos aptámero-molécula diana.

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. Más específicamente, la divulgación proporciona métodos para la purificación de complejos de afinidad por aptámero (o complejos covalentes de aptámero), eliminando tanto la diana libre como los aptámeros libres de los complejos de afinidad por aptámero (o complejos covalentes de aptámero), eliminando así posibles fuentes de ruido en el ensayo. La presente divulgación también proporciona ensayos basados en aptámeros y fotoaptámeros para la cuantificación de molécula diana en los que el aptámero (o fotoaptámero) puede separarse del complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de fotoaptámero) para la detección final usando cualquier método de detección de ácidos nucleicos adecuado. La divulgación también describe construcciones de aptámero que facilitan la separación de los componentes del ensayo del complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de fotoaptámero) y permiten el aislamiento del aptámero para la detección y/o cuantificación. La divulgación también describe métodos, dispositivos, kits y reactivos que ofrecen sensibilidad y especificidad mejoradas empleando aptámeros que tienen constantes de disociación lentas de sus dianas y eficiencias de unión mejoradas. La presente divulgación también proporciona métodos, dispositivos, kits y reactivos para el análisis múltiple de una muestra de ensayo, en los que múltiples dianas en la muestra de ensayo pueden detectarse y/o cuantificarse simultáneamente. Por último, estos métodos y reactivos permiten la conversión de una concentración de diana (por ejemplo, una concentración de proteína diana en una muestra de ensayo) en una concentración de ácido nucleico que puede detectarse y cuantificarse por cualquiera de una amplia variedad de métodos de detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Además, una vez la concentración de diana se ha convertido eficazmente en una concentración de ácido nucleico correspondiente, pueden entonces emplearse etapas de amplificación y de detección de ácidos nucleicos estándar para aumentar la señal. Finalmente, la presente divulgación proporciona métodos para el análisis múltiple de una muestra de ensayo. Los métodos según la presente divulgación pueden realizarse *in vitro*.

Ensayo de afinidad de captura única. En una realización, una muestra de ensayo se pone en contacto con un aptámero que tiene una afinidad específica por una molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, se formará un complejo de afinidad por aptámero en la muestra de ensayo. En una realización, una marca se une a la molécula diana del complejo de afinidad por aptámero (obsérvese que la marca se diseña de forma que pueda unirse a la diana de un modo que no altere el complejo de afinidad por aptámero). En otra realización, la marca se une a la diana antes de la formación del complejo de afinidad por aptámero. El complejo de afinidad por aptámero marcado se captura a continuación sobre un soporte sólido. La unión se lleva a cabo poniendo en contacto el soporte sólido con el complejo de afinidad por aptámero y dejando que la marca se asocie tanto directa como indirectamente con un agente de captura apropiado que está unido al soporte sólido. El complejo de afinidad por aptámero que se ha asociado al agente de captura sobre el soporte sólido se separa del resto de la mezcla de muestra de ensayo, eliminando así cualquier aptámero libre. Los aptámeros que son complejados con la diana en el complejo de afinidad por aptámero pueden ser liberados del soporte sólido por disociación del complejo de afinidad por aptámero. Finalmente, los aptámeros liberados pueden detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos de detección de ácidos nucleicos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ácido nucleico, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares. En algunas realizaciones, que dependen de los métodos de detección de ácidos nucleicos particulares usados, los aptámeros pueden detectarse mientras que todavía una parte del complejo de afinidad por aptámero.

Ensayo de afinidad de captura doble. En otra realización, una muestra de ensayo se pone en contacto con un aptámero que incluye una primera marca separable y tiene una afinidad específica por una molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, se formará un complejo de afinidad por aptámero en la muestra de ensayo. El complejo de afinidad por aptámero se captura sobre un primer soporte sólido. La unión se lleva a cabo poniendo en contacto un primer soporte sólido con el complejo de afinidad por aptámero y dejando que la primera marca separable incluida en el aptámero se disocie, tanto directa como indirectamente, con un primer agente de captura apropiado que está unido al primer soporte sólido. Obsérvese que además de complejos de afinidad por aptámero, el aptámero sin complejar también se unirá al primer soporte sólido. El complejo de afinidad por aptámero y el aptámero sin complejar que se ha asociado a la sonda sobre el soporte sólido se separa entonces del resto de la mezcla, eliminando así la diana libre y toda la otra materia sin complejar en la muestra de ensayo. Tras la separación, el complejo de afinidad por aptámero (junto con cualquier aptámero sin complejar) se libera del primer soporte sólido usando un método apropiado para la primera marca separable particular que se emplea. Una segunda marca (que puede ser igual o diferente de la primera marca separable) se une a la molécula diana del complejo de afinidad por aptámero (obsérvese que la segunda marca se diseña de forma que pueda unirse a la diana de un modo que no altere el complejo de afinidad por aptámero). El complejo de afinidad por aptámero se captura sobre un segundo soporte sólido dejando que la segunda marca se asocie tanto directa como indirectamente con un segundo agente de captura apropiado que está unido a un segundo soporte sólido. El complejo de afinidad por aptámero que se ha asociado a la sonda sobre el soporte sólido se separa del resto de la mezcla, eliminando así cualquier aptámero libre. Los aptámeros que son complejados con la diana en el complejo de afinidad por aptámero pueden ser liberados del soporte sólido por disociación del complejo de afinidad por

aptámero. Finalmente, los aptámeros que han sido liberados del complejo de afinidad por aptámero pueden detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos de ácidos nucleicos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ADN, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares. En algunas realizaciones, la diana puede hacerse reaccionar con la segunda marca mientras que el complejo de afinidad por aptámero está todavía inmovilizado al primer soporte sólido. El añadir la segunda marca después de la etapa de separación elimina el marcado de moléculas diana que no son parte de un complejo de afinidad por aptámero. En algunas realizaciones, donde se usa un método de detección de ácidos nucleicos, los aptámeros pueden detectarse mientras que todavía una parte del complejo de afinidad por aptámero.

Ensayo de fotorreticulación por captura única. En otra realización (el "ensayo de fotorreticulación por captura única de base"), una muestra de ensayo se pone en contacto con un fotoaptámero que tiene una afinidad específica por una molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, se formará un complejo de afinidad por fotoaptámero en la muestra de ensayo. El complejo de afinidad por aptámero se convierte en un complejo covalente de aptámero por la excitación apropiada del grupo de fotorreticulación. Una marca se une a la molécula diana del complejo covalente de aptámero (obsérvese que la marca se diseña de forma que pueda unirse a la diana de un modo que no altere el complejo covalente de aptámero). El complejo covalente de aptámero se captura sobre un soporte sólido. La unión se lleva a cabo poniendo en contacto el soporte sólido con el complejo covalente de aptámero y dejando que la marca se asocie tanto directa como indirectamente con un agente de captura apropiado que está unido al soporte sólido. El complejo covalente de aptámero que se ha asociado al agente de captura sobre el soporte sólido se separa del resto de la mezcla de muestra de ensayo, eliminando así cualquier fotoaptámero libre. El fotoaptámero que es parte del complejo covalente de aptámero puede detectarse y/o cuantificarse (mientras que todavía está unido al soporte sólido) usando cualquiera de varios métodos, que incluyen, pero no se limitan a, el método de ensayo Invader, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

En otra realización, el ensayo de fotorreticulación por captura única descrito anteriormente se modifica de forma que, antes de la detección del fotoaptámero, se use una etapa de amplificación de ácido nucleico tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, para crear una o más copias de los fotoaptámeros que son una parte de los complejos covalentes de aptámero que están unidos al soporte sólido. Estas copias de los fotoaptámeros pueden entonces liberarse y posteriormente detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ADN, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

En otra realización del ensayo de fotorreticulación por captura única, el grupo de fotorreticulación del fotoaptámero se une al aptámero mediante un conector escindible. En una realización, este conector escindible es un conector fotoescindible, pero puede ser un conector químicamente escindible o cualquier otro conector escindible que pueda escindirse para liberar la molécula diana de la marca en cualquier momento deseable en el ensayo. En esta realización, el ensayo de fotorreticulación por captura única de base descrito anteriormente se modifica de forma que, antes de la detección del fotoaptámero, el conector escindible se use para liberar el fotoaptámero del complejo covalente de fotoaptámero que está unido al soporte sólido. Los aptámeros liberados pueden detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ADN, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

En otra realización más del ensayo de fotorreticulación por captura única, la marca que se une a la molécula diana se une mediante un conector escindible. En una realización, este conector escindible es un conector fotoescindible. En otras realizaciones de este ensayo, la marca se une mediante un conector químicamente escindible o cualquier otro conector escindible adecuado que pueda escindirse para liberar la molécula diana de la marca en cualquier momento deseable en el ensayo. En esta realización, el ensayo de fotorreticulación por captura única descrito anteriormente se modifica de forma que, antes de la detección del fotoaptámero, el conector escindible se use para liberar el complejo covalente de aptámero del soporte sólido. El complejo covalente de aptámero liberado puede detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ADN, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

Ensayo de fotorreticulación por captura doble. En otra realización (el "ensayo de fotorreticulación por captura doble de base"), una muestra de ensayo se pone en contacto con un fotoaptámero que contiene una primera marca separable y que tiene una afinidad específica por una molécula diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula diana, se formará un complejo de afinidad por fotoaptámero en la muestra de ensayo. El complejo de afinidad por fotoaptámero se convierte en un complejo covalente de aptámero por la excitación apropiada del grupo de fotorreticulación. El complejo covalente de aptámero se captura sobre un primer soporte sólido. La unión se lleva a cabo poniendo en contacto un primer soporte sólido con el complejo covalente de aptámero y dejando que la primera etiqueta separable incluida en el fotoaptámero se asocie tanto directa como indirectamente con un primer agente de captura apropiado unido al primer soporte sólido. Obsérvese que además de complejos covalentes de fotoaptámero, también pueden unirse fotoaptámeros sin complejar al soporte sólido. El complejo covalente de aptámero y el aptámero sin complejar que se ha asociado a la sonda sobre el soporte sólido se separa del resto de

la mezcla, eliminando así la diana libre y toda la otra materia sin complejar en la muestra de ensayo. Tras la separación, el complejo covalente de fotoaptámero (junto con cualquier fotoaptámero sin complejar) se libera del soporte sólido usando un método apropiados para la primera marca separable particular que se emplea. Una segunda marca se une a la molécula diana del complejo covalente de aptámero (obsérvese que la segunda marca se diseña de forma que pueda unirse a la diana de un modo que no altere el complejo covalente de aptámero). El complejo covalente de aptámero se captura sobre un segundo soporte sólido. La unión se lleva a cabo poniendo en contacto el segundo soporte sólido con el complejo covalente de aptámero y dejando que la segunda marca se asocie tanto directa como indirectamente con un segundo agente de captura apropiado unido al segundo soporte sólido. El complejo covalente de aptámero que se ha asociado al segundo agente de captura sobre el soporte sólido se separa del resto de la mezcla, eliminando así cualquier fotoaptámero libre. El fotoaptámero que es parte del complejo covalente de aptámero puede detectarse y/o cuantificarse (mientras que todavía esté unido al soporte sólido) usando cualquiera de varios métodos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, el método de ensayo Invader, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

En otra realización, el ensayo de fotorreticulación por captura doble descrito anteriormente se modifica de forma que, antes de la detección, se use una etapa de amplificación de ácidos nucleicos tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, para crear una o más copias de los fotoaptámeros que son una parte del complejo covalente de aptámero que está unido al soporte sólido. Estas copias del fotoaptámero pueden ser liberadas y posteriormente detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ADN, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

En otra realización, el ensayo de fotorreticulación por captura doble descrito anteriormente se modifica de forma que el grupo de fotorreticulación del fotoaptámero esté unida al aptámero mediante un conector escindible. En una realización, este conector escindible es un conector fotoescindible. En otras realizaciones de este ensayo, el grupo de fotorreticulación del fotoaptámero se une al aptámero mediante un conector químicamente escindible o cualquier otro conector escindible adecuado que pueda escindirse para liberar el grupo de fotorreticulación del complejo covalente de fotoaptámero en cualquier momento deseable en el ensayo. En esta realización, el ensayo de fotorreticulación por captura doble descrito anteriormente se modifica de forma que, antes de la detección de forma que, antes de la detección del fotoaptámero, el conector escindible se use para liberar el fotoaptámero del complejo covalente de fotoaptámero que está unido al soporte sólido. Los fotoaptámeros liberados pueden detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ADN, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

En otra realización más en el ensayo de fotorreticulación por captura doble, la marca que se une a la molécula diana se une mediante un conector escindible. En una realización, este conector escindible es un conector fotoescindible. En otras realizaciones de este ensayo, la marca se une mediante un conector químicamente escindible o cualquier otro conector escindible adecuado que pueda escindirse para liberar la molécula diana de la marca en cualquier momento deseable en el ensayo. En esta realización, el ensayo de fotorreticulación por captura doble descrito anteriormente se modifica de forma que, antes de la detección del fotoaptámero, el conector escindible se use para liberar el complejo covalente de fotoaptámero del soporte sólido. El complejo covalente de fotoaptámero liberado puede detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de varios métodos adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, el método de ensayo Invader, un chip de ADN, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), y similares.

Exposición cinética. En otra realización, puede usarse una exposición cinética para aumentar la especificidad y sensibilidad de los ensayos desvelados en el presente documento. La exposición cinética, descrito por primera vez en los documentos US2007/0166741 y US2007/0166740, proporciona el uso de constantes de disociación relativamente larga de complejos aptámero-diana específicos con respecto a complejos no específicos para aumentar la especificidad de ciertos ensayos. Además, el documento US2009/0004667 titulado "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates", desvela que pueden identificarse aptámeros de constante de disociación lenta empleando un proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta durante el proceso SELEX y/o usando ciertos nucleótidos modificados (véase el documento US2009/0098549 titulado "Improved SELEX and PhotoSELEX").

Los ensayos anteriormente descritos (los ensayos de afinidad de captura única, los ensayos de afinidad de captura doble, el ensayo de fotorreticulación por captura única y el ensayo de fotorreticulación por captura doble) pueden cada uno mejorarse mediante la incorporación de una exposición cinética. Para fines de ilustración solo, lo siguiente describe cómo una exposición cinética puede añadirse a realizaciones seleccionadas del ensayo de afinidad de captura doble y el ensayo de fotorreticulación por captura doble. Debe entenderse que una exposición cinética puede añadirse a cualquiera de otros ensayos y métodos descritos en el presente documento de una manera similar. Debe entenderse adicionalmente que la exposición cinética puede añadirse en cualquier momento adecuado en cualquiera de los ensayos y métodos descritos, además de los sitios (etapas) indicados en las diversas realizaciones descritas en el presente documento.

En una realización, una exposición cinética se inserta en el ensayo de afinidad de captura doble después de la etapa en la que el complejo de afinidad por aptámero y el aptámero sin complejar que se ha asociado a la sonda sobre el primer soporte sólido se separa del resto de la mezcla y antes de la etapa en la que el aptámero en el complejo de afinidad por aptámero es tanto liberado como directamente detectado o cuantificado. En una realización, la exposición cinética se realiza después de que el complejo de afinidad por aptámero se libere del primer soporte sólido. En esta realización, la exposición cinética se realiza liberando el complejo de afinidad por aptámero en un tampón que contiene una alta concentración de un competidor y posteriormente incubando los complejos de afinidad por aptámero en la solución de competidor durante un tiempo inferior o igual a la semivida de disociación del complejo de afinidad por aptámero.

En otra realización, una exposición cinética se inserta en el ensayo de fotorreticulación por captura doble después de la formación del complejo de afinidad por aptámero y antes de la etapa de reticulación. En una realización, la exposición cinética se realiza añadiendo un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad por aptámero y posteriormente incubando los complejos de afinidad por aptámero en la solución de competidor durante un tiempo inferior o igual a la semivida de disociación del complejo de afinidad por aptámero.

Métodos de detección y cuantificación. Como se ha mencionado anteriormente, es posible detectar el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero en el caso de los ensayos de fotorreticulación) empleando varias técnicas de detección de ácidos nucleicos diferentes, que incluye espectrometría de masas, el ensayo Invader, chips de ADN, métodos de PCR cuantitativa, y similares.

En una realización, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se detecta y/o cuantifica usando un chip de ADN. En esta realización, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) que se ha asociado al soporte sólido se eluye y se hibrida con una secuencia de sonda complementaria que se ha impreso sobre un chip de ADN. En una realización, la secuencia de sonda complementaria es complementaria al aptámero entero. En otra realización, la secuencia de sonda complementaria es complementaria a solo una porción del aptámero. En otra realización, la sonda es complementaria a una secuencia añadida al aptámero con el fin de hibridación. Con el fin de detectar el aptámero hibridado (o fotoaptámero) sobre el chip de ADN, puede introducirse una etiqueta. En una realización, la etiqueta se incorpora en el aptámero en el momento en el que el aptámero (o fotoaptámero) se sintetiza. Por ejemplo, puede incorporarse un colorante fluorescente en un aptámero químicamente (o enzimáticamente) sintetizado. En una realización, una etiqueta se añade al aptámero durante la síntesis del aptámero. En otras realizaciones, una etiqueta se añade al aptámero en cualquier momento antes, durante o después del ensayo. En otra realización, pueden usarse técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tales como PCR para amplificar la población de aptámeros (o fotoaptámeros). En este caso, una etiqueta también puede incorporarse como parte de la etapa de amplificación.

En otra realización, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se detecta y/o cuantifica usando espectrometría de masas. En esta realización, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) que se ha asociado al soporte sólido se eluye y analiza usando espectrometría de masas, que produce un espectro de picos que puede usarse para identificar, y por tanto detectar, la molécula diana. Una vez se ha detectado la molécula diana, opcionalmente también puede cuantificarse por cualquier técnica adecuada. En una realización, donde la molécula diana es una proteína o polipéptido, antes de usar espectrometría de masas para analizar el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero), el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) puede digerirse con enzimas proteasas, tales como, por ejemplo, proteinasa K o tripsina, para producir fragmentos de la molécula diana unida que pueden usarse para identificar la molécula diana, y así permitir la detección y cuantificación opcional de la molécula diana.

En otra realización, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se detecta y/o cuantifica usando Q-PCR. Como se ha mencionado anteriormente, esto puede hacerse tanto mientras que el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) está unido al soporte sólido como después de liberarse del soporte sólido. El complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se cuantifica realizando PCR y determinando, tanto directa como indirectamente, la cantidad o concentración de aptámero que se había unido a su molécula diana en la muestra de ensayo. La cantidad o concentración de la molécula diana en la muestra de ensayo es generalmente directamente proporcional a la cantidad o concentración del aptámero cuantificado usando Q-PCR. Un método a modo de ejemplo que puede emplearse para cuantificar un complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) de este modo es el ensayo TaqMan® (PE Biosystems, Foster City, Calif.; véase también la patente de EE.UU. N.º 5.210.015).

En otra realización, el aptámero se disocia opcionalmente de su molécula diana correspondiente, antes de la detección y/o cuantificación. El aptámero libre puede detectarse y medirse usando cualquier método adecuado conocido para la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos.

Ensayos múltiples. En otra realización, los ensayos y métodos descritos anteriormente se usan para detectar y/o cuantificar dos o más dianas. En una realización, se usan múltiples aptámeros en el ensayo de afinidad de captura doble para cuantificar y/o detectar múltiples dianas. Después de la liberación final de los aptámeros de los complejos de afinidad por aptámero, cada uno de los aptámeros puede entonces detectarse usando métodos adecuados para

la detección múltiple de ácidos nucleicos. En un método, se usa un chip de ADN múltiple para detectar y/o cuantificar los aptámeros. Cualquiera de los ensayos desvelados en el presente documento puede realizarse en un modo múltiple para detectar múltiples dianas. Debido a que no hay límites inherentes a la escala del multiplexado, estos ensayos múltiples pueden usarse para detectar, por ejemplo, 2 o más dianas, 10 o más dianas, 25 o más dianas, 50 o más dianas, 100 o más dianas, 250 o más dianas, 500 o más dianas, o 1000 o más dianas.

Reactivos y kits. En una realización, los kits para las diversas aplicaciones de detección, que incluyen, sin limitación, kits de diagnóstico, kits de descubrimiento de biomarcadores, kits de ensayo ambiental, kit de detección de riesgos biológicos o armas biológicas y kits para detectar dianas en aplicaciones de ciencias de la vida y de química analítica, pueden prepararse basándose en los métodos desvelados en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Las FIGS. 1A y 1B ilustran métodos a modo de ejemplo para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo.

Las FIGS. 2A y 2B ilustran métodos a modo de ejemplo para la detección y/o cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo.

Las FIGS. 3A-L ilustran construcciones de aptámero a modo de ejemplo para su uso con los ensayos descritos en el presente documento.

La FIG. 4 presenta una lista de más de 500 dianas para las que se han producido aptámeros. Muchos de estos aptámeros se han diseñado para tener constantes de disociación lentas de su diana respectiva.

Las FIGS. 5A ilustran un ejemplo de una marca de hibridación. Las FIG. 5B a 5D ilustran ejemplos de construcciones de aptámero que incluyen un elemento escindible o separable, una marca (por ejemplo, biotina), un espaciador y una etiqueta (por ejemplo, Cy3).

La FIG. 6 ilustra las construcciones de aptámero y de cebador usadas en los métodos de ensayo descritos en la presente divulgación. Cy3 representa un colorante de cianina 3, B una biotina, PC un conector fotoescindible, ANA un grupo de reticulación fotorreactivo, (AB)₂ un par de restos de biotina separados por residuos dA, y (T)₈ un conector poli dT. Las construcciones de cebador son complementarias a la región fija de 3' completa de las construcciones de aptámero. FIG. 6A. Construcción de aptámero usada en el protocolo del ensayo de afinidad de captura única. FIG. 6B. Construcción de aptámero usada en el protocolo del ensayo de afinidad de captura doble. FIG. 6C. Construcción de aptámero usada en el protocolo del ensayo de reticulación por captura única. FIG. 6D. Construcción de aptámero usada en el protocolo del ensayo de reticulación por captura doble.

Las FIGS. 7A, 7B y 7C ilustran curvas de respuesta a dosis (URF frente al logaritmo de la concentración de proteína diana de entrada) para la detección de proteínas diana en tampón usando el protocolo del ensayo de afinidad con detección por micromatriz. Se representan valores de control no de proteína por duplicado en el marco del eje y. Las líneas continuas representan un ajuste sigmoide a través de los puntos de datos. Las líneas discontinuas representan dos desviaciones estándar de los valores no de proteína por duplicado. FIG. 7A. Proteína diana bFGF. FIG. 7B. Proteína diana FGF7. FIG. 7C. Proteína diana linfotactina.

La FIG. 8 ilustra las curvas de respuesta a dosis para tres mediciones por duplicado de la proteína diana linfotactina en tampón usando el protocolo de ensayo por afinidad con detección por micromatriz. Se representan los valores de control no de proteína por duplicado en el marco del eje y. Las líneas continuas representan ajustes sigmoides a través de los puntos de datos para cada uno de los tres duplicados.

La FIG. 9 ilustra la curva de respuesta a dosis (URF frente al logaritmo de la concentración de proteína diana de entrada) para la detección de la proteína diana linfotactina en 10 % de plasma humano usando el protocolo de ensayo de afinidad y detección por micromatriz. Se representan los valores de control no de proteína por duplicado en el marco del eje y y en círculo. La línea continua representa un ajuste sigmoide a través de los puntos de datos.

La FIG. 10 ilustra la curva de respuesta a dosis (URF frente al logaritmo de la concentración de proteína diana de entrada) para la detección de la proteína diana linfotactina en 10 % de sangre humana completa usando el protocolo de ensayo de afinidad y detección por micromatriz. Se representan los valores de control no de proteína por duplicado en el marco del eje y y en círculo. La línea continua representa un ajuste sigmoide a través de los puntos de datos.

La FIG. 11 ilustra la curva de respuesta a dosis (URF frente al logaritmo de la concentración de proteína diana de entrada) para la detección de la proteína diana angiogenina en tampón usando el protocolo del ensayo de fotorreticulación con detección por micromatriz. La línea continua representa un ajuste sigmoide a través de los puntos de datos. Están en círculo cuatro puntos de datos no de proteína por duplicado.

La FIG. 12 ilustra la curva de respuesta a dosis (concentración de aptámero detectada frente a la concentración de proteína diana de entrada) para la detección de angiogenina en tampón usando el protocolo de ensayo de afinidad con detección por Q-PCR. Se indican cuatro mediciones de no proteína por duplicado en el eje y como círculos blancos.

Las FIGS. 13A a 13C ilustran curvas de respuesta a dosis para aptámeros de constante de disociación lenta frente a aptámeros tradicionales para tres dianas diferentes.

La FIG. 14 ilustra la disposición de muestras para un estudio de reproducibilidad del ensayo.

La FIG. 15 ilustra los CV del estudio de muestras reunidas y no reunidas.

La FIG. 16 presenta las modificaciones de bases de nucleótidos tratadas en la presente divulgación. Los grupos R que pueden usarse se describen además de los conectores (X) que pueden usarse entre el punto de

unión de nucleótidos y se muestra el grupo R. También se indican las posiciones para la modificación de los nucleótidos.

Descripción detallada

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro del nivel de experiencia en la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. 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).

Todas las publicaciones, documentos de patente publicados y solicitudes de patente citados en esta memoria descriptiva son indicativos del nivel de experiencia en la(s) materia(s) al que se refiere la invención.

La presente divulgación incluye métodos, dispositivos, reactivos y kits mejorados 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 optimizando las condiciones que afectan a uno o más de (1) la actividad de aptámeros, (2) la eficiencia de lograr equilibrios de unión para complejos aptámero-molécula diana, (3) la formación de enlace(s) covalente(s) entre un aptámero y su molécula diana, (4) la eliminación de reactivos y componentes de muestra en exceso, (5) el uso de aptámeros de constante de disociación lenta, (6) construcciones de aptámero deseables, y (7) la detección de complejos aptámero-molécula diana.

Es de notar que, a menos que se especifique de otro modo en una realización particular, los métodos para la detección y/o cuantificación de una molécula diana descritos en el presente documento son independientes del orden específico en el que se describen las etapas. Para fines de ilustración, los métodos se describen como una secuencia específica de etapas; sin embargo, debe entenderse que es posible cualquier número de permutaciones de la secuencia especificada de etapas, mientras que se lleve a cabo el objetivo del ensayo particular que se describe. Dicho de otra forma, las etapas citadas en cualquiera de los métodos desvelados pueden realizarse en cualquier orden factible, y los métodos de la divulgación no se limitan a ningún orden particular presentado en cualquiera de las realizaciones descritas, los ejemplos, o las reivindicaciones adjuntas. Además, por comodidad y facilidad de presentación, los diversos métodos se describen con referencia a una única molécula diana y un único aptámero. Sin embargo, debe entenderse que cualquiera de los métodos descritos puede realizarse en un formato múltiple que puede proporcionar la detección y/o cuantificación simultánea de múltiples dianas usando múltiples aptámeros, de forma que, por ejemplo, múltiples moléculas diana en una muestra de ensayo puedan detectarse y/o cuantificarse poniendo en contacto la muestra de ensayo con múltiples aptámeros, en los que cada aptámero tiene una afinidad específica por una molécula diana particular (es decir, en un formato múltiple).

Con referencia a las FIGS. 1A y 1B, la presencia de una molécula diana en una muestra de ensayo se detecta y/o cuantifica poniendo primero en contacto una muestra de ensayo con un aptámero que tiene una afinidad específica por una molécula diana. El método puede aplicarse a la detección y/o cuantificación de varias dianas específicas por el uso del número correspondiente de aptámeros específicos, es decir, un formato múltiple. Se presenta una única discusión objetivo solo para facilitar la presentación. Se forma un complejo de afinidad por aptámero por el aptámero que se une a su molécula diana si la muestra de ensayo contiene la molécula diana. El complejo de afinidad por aptámero se convierte opcionalmente, usando un método apropiado para el aptámero que se emplea, en un complejo covalente de aptámero donde el aptámero está covalentemente unido a su molécula diana. Entonces se emplea una etapa de separación para eliminar el aptámero libre. El complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se detecta y/o cuantifica. Pueden usarse varios métodos de detección diferentes para detectar el complejo de afinidad por aptámero, por ejemplo, ensayos de hibridación, espectroscopía de masas, o Q-PCR.

Como se trata anteriormente, los ensayos descritos aquí se han agrupado para fines de ilustración en 4 categorías: Ensayos de afinidad de captura única; ensayos de afinidad de captura doble, ensayos de fotorreticulación por captura única; y ensayos de fotorreticulación por captura doble. Sin embargo, debe entenderse que se contemplan otras agrupaciones, combinaciones y orden de etapas y todos entran dentro del alcance de la divulgación.

Las cuatro categorías de ensayo comparten una etapa común en la que los complejos aptámero-diana se separan del aptámero libre (o fotoaptámero libre) por una etapa de separación que captura la proteína (diana). Esta etapa de separación se denomina en el presente documento la separación de "Captura 2". Los dos ensayos de "captura doble" comparten una cosa en común adicional en la que los complejos aptámero-diana se separan de la diana libre por una etapa de separación que captura el aptámero. Esta última etapa de separación se denomina en el presente documento la separación de "Captura 1". Métodos de implementación de cada una de estas etapas se describen en detalle más adelante.

Se desvela además el uso de una exposición cinética en cada una de estas categorías de ensayo. Tradicionalmente, la especificidad en la detección de una diana deseada ha mejorado mediante el uso de un ensayo de sándwich en el que se usan dos reactivos de captura. Se ha observado sorprendentemente que la aplicación de una exposición cinética a un procedimiento de detección que emplea aptámeros elimina la necesidad de potenciar la especificidad introduciendo un segundo reactivo de captura. Si se introduce una exposición cinética, es poco probable que se vuelvan a formar complejos no específicos entre el aptámero y cualquier molécula no diana tras su disociación. Como los complejos no específicos generalmente se disocian más rápidamente que un complejo de afinidad por aptámero, una exposición cinética reduce la verosimilitud de que un aptámero participe en un complejo no específico con una no diana. Una exposición cinética eficaz puede proporcionar al ensayo especificidad adicional, más allá de la del evento de unión del aptámero inicial y cualquier interacción covalente posterior. Así, la exposición cinética ofrece un segundo determinante de especificidad en estos métodos de detección. Métodos de implementación de la exposición cinética se describen en detalle más adelante.

Con referencia a las FIGS. 2A (ensayo de afinidad de etapa doble) y 2B (ensayo de reticulación de etapa doble), en un método a modo de ejemplo para la detección y/o cuantificación de una molécula diana que puede estar presente en una muestra de ensayo, una muestra de ensayo se pone en contacto con un aptámero (o fotoaptámero) que incluye una primera marca y tiene una afinidad específica por una molécula diana. Se deja que se forme un complejo de afinidad por aptámero que incluye un aptámero (o fotoaptámero) unido a su molécula diana, donde la muestra de ensayo contiene la molécula diana. En el ejemplo de fotorreticulación (2B), el complejo de afinidad por aptámero se convierte, usando un método apropiado para el aptámero que se emplea, en un complejo covalente de aptámero donde el fotoaptámero está covalentemente unido a su molécula diana. El complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se une a un primer soporte sólido mediante un primer elemento de captura. La unión se lleva a cabo poniendo en contacto el primer soporte sólido con el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) y dejando que la marca incluida en el aptámero se asocie tanto directa como indirectamente con un primer elemento de captura que está unido al primer soporte sólido. El complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) que se ha asociado al primer elemento de captura sobre el primer soporte sólido se separa del resto de la mezcla. Tras la separación, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se libera del primer soporte sólido usando un método apropiado para la marca particular que se emplea. Alternativamente, la marca puede unirse al aptámero mediante un resto escindible, donde tal resto escindible se escinde ahora para liberar la afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) del primer soporte sólido. Se une una segunda marca (que puede ser igual o diferente de la primera marca) a la molécula diana del complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero). Opcionalmente, puede realizarse una exposición cinética para aumentar la especificidad del ensayo y disminuir la señal de fondo. El complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se une a un segundo soporte sólido. La unión se lleva a cabo poniendo en contacto el segundo soporte sólido con el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) y dejando que la segunda marca incluida en la diana se asocie tanto directa como indirectamente con un segundo elemento de captura que está unido al segundo soporte sólido. El complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) que se ha asociado al segundo elemento de captura sobre el segundo soporte sólido se separa del resto de la mezcla. El complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se detecta y opcionalmente se cuantifica.

En otra realización, el aptámero (o fotoaptámero) se disocia primero de su molécula diana respectiva y el aptámero libre (o fotoaptámero) se detecta y opcionalmente se cuantifica.

El complejo de afinidad por aptámero puede detectarse utilizando cualquier técnica de detección de ácidos nucleicos adecuada, tal como, por ejemplo, hibridación, Q-PCR, EM, y similares. Dependiendo de qué técnica se emplee, el aptámero puede diseñarse o modificarse para incluir una marca. Esto puede llevarse a cabo en el momento durante la síntesis (tanto enzimática como químicamente) o en cualquier momento durante el ensayo (es decir, en cualquier momento antes de la detección).

El método desvelado en el presente documento permite la detección de la presencia y cantidad de una molécula diana detectando el aptámero libre eluido del ensayo. Esto permite la detección y cuantificación convenientes de la molécula diana, debido a la relativa simplicidad de detección, cuantificación y amplificación de ácidos nucleicos, y proporciona ensayos de detección de diana que tienen una relación señal con respecto a ruido muy favorable.

Ensayos de afinidad

Ensayo de afinidad de captura única (solo Captura 2)

En una realización, se realiza un ensayo de afinidad de captura única usando un separación de Captura 2. Este método funciona bien cuando la matriz de muestra no es muy compleja, de manera que otros componentes en la muestra no compiten por la marca. También funciona bien para muestras en las que la diana está presente en alto número de copias o concentración.

Se proporcionan aptámeros que tienen alta afinidad y especificidad por una molécula diana. En una realización, se usa la construcción de aptámero ilustrada en la FIG. 6A. En esta realización, los aptámeros se ponen en contacto

con una muestra que puede contener una molécula diana para formar una mezcla que contiene los aptámeros, la molécula diana, y opcionalmente molécula no diana. Donde la molécula diana está presente en la muestra, se forman complejos de afinidad por aptámero. La mezcla puede incubarse opcionalmente durante un periodo de tiempo suficiente para lograr la unión en equilibrio del aptámero a la molécula diana (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos).

En una realización, la mezcla puede opcionalmente someterse a una exposición cinética. La exposición cinética ayuda a reducir cualquier unión no específica entre el aptámero y cualquier molécula no diana presente en la muestra. En una realización, se añade sulfato de dextrano 10 mM y la mezcla se incuba durante aproximadamente 15 minutos. Esta y otras realizaciones de la exposición cinética se describen en más detalle más adelante.

En una realización, se realiza la separación de Captura 2 para eliminar el aptámero libre. En una realización, la mezcla que contiene complejos de afinidad por aptámero se trata con un agente que introduce una marca de captura al componente de molécula diana de los complejos de afinidad por aptámero. En otras realizaciones, la marca se introduce antes de que los aptámeros se pongan en contacto con la mezcla del texto, tanto antes de la unión en equilibrio como antes de la exposición cinética. En una realización, la diana es una proteína o péptido, y una marca de biotina se une a la molécula diana tratando con NHS-PEO4-biotina (este y otros métodos de marcado se describen en detalle más adelante). La mezcla se pone entonces en contacto con un soporte sólido, que tiene un elemento de captura adherido a su superficie que es capaz de unirse a la marca de captura diana. En esta realización, el elemento de captura sobre el soporte sólido normalmente se selecciona de forma que se una a la marca de captura diana con alta afinidad y especificidad. En una realización, el soporte sólido es perlas magnéticas (tales como DynaBeads MyOne Streptavidin C1) contenidas dentro de un pocillo de una placa de microtitulación y el elemento de captura es estreptavidina. Las perlas magnéticas proporcionan un método conveniente para la separación de componentes separados de la mezcla (estos y otros soportes sólidos y elementos de captura se describen en detalle más adelante). Así, los complejos de afinidad por aptámero contenidos en la mezcla se unen al soporte sólido mediante la interacción de unión de la marca de captura diana y el elemento de captura. El complejo de afinidad por aptámero se separa entonces del resto de la mezcla, por ejemplo, lavando el soporte para eliminar aptámeros no complejados. En una realización, el aptámero del complejo de afinidad por aptámero puede entonces liberarse para procesamiento adicional por uno o más de los siguientes tratamientos: sal alta, pH alto, pH bajo o temperatura elevada. Esta y otras separaciones de Captura 2 se describen en más detalle más adelante.

En otra realización, el aptámero liberado de la separación de Captura 2 se detecta y opcionalmente cuantifica por cualquier método de detección de ácidos nucleicos adecuado, tal como, por ejemplo, hibridación en chip de ADN, Q-PCR, espectroscopía de masas, y similares. Estos métodos de detección se describen en más detalle más adelante. En otra realización, el aptámero en el complejo de afinidad por aptámero se detecta y opcionalmente cuantifica mientras que todavía está en contacto con el soporte sólido. En una realización, el aptámero comprende un resto detectable para facilitar esta etapa de detección. El resto detectable se elige basándose en el método de detección que va a emplearse. En una realización, el resto detectable o etiqueta se añade al aptámero durante la síntesis o antes del ensayo. En otra realización, el resto detectable se añade al aptámero tanto durante el ensayo como durante la detección. El aptámero detectado puede entonces correlacionarse con la cantidad o concentración de diana en la muestra de ensayo original.

Ensayo de afinidad de captura doble (Captura 1 y 2)

El ensayo de afinidad de captura doble es similar al ensayo de afinidad de captura única con la adición de una etapa de separación adicional. Esta etapa de separación adicional generalmente proporciona sensibilidad y especificidad adicionales.

En una realización, se proporcionan aptámeros que tienen alta afinidad y especificidad por una molécula diana y que tiene una primera marca separable. En otra realización, la primera marca separable se añade en cualquier momento en el ensayo antes de la separación de Captura 1. En una realización, esta primera marca separable es una biotina fotoescindible. En una realización, se usa la construcción de aptámero ilustrada en la FIG. 6B. Estas y otras marcas y restos escindibles y aptámero que contiene tales marcas y restos escindibles se describen en detalle más adelante. Los aptámeros se ponen en contacto con una muestra que puede contener una molécula diana para formar una mezcla que contiene el aptámero, la molécula diana, y opcionalmente molécula no diana. Donde la molécula diana está presente en la muestra, se forman complejos aptámero-molécula diana (complejos de afinidad por aptámero). La mezcla puede opcionalmente incubarse durante un periodo de tiempo suficiente para lograr la unión en equilibrio del aptámero a la molécula diana (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos).

En una realización, la separación de Captura 1 se realiza para eliminar cualquier diana libre. La mezcla se pone en contacto con un primer soporte sólido que tiene un elemento de captura adherido a su superficie que es capaz de unirse a la marca de captura del aptámero, preferentemente con alta afinidad y especificidad. En una realización, la primera marca separable es una biotina fotoescindible, el primer soporte sólido es perlas de agarosa en una columna y el elemento de captura es estreptavidina. Por ejemplo, pueden usarse perlas de estreptavidina inmovilizadas de Pierce. Estos y otros soportes sólidos y elementos de captura se describen en detalle más

adelante. Así, los complejos de afinidad por aptámero contenidos en la mezcla se unen al primer soporte sólido mediante la interacción de unión de la primera marca separable y el primer elemento de captura. Los complejos de afinidad por aptámero se separaron del resto de la mezcla, por ejemplo, lavando el primer soporte sólido para eliminar moléculas no unidas.

En una realización, los complejos de afinidad por aptámero que siguen unidos al soporte sólido se tratan entonces con un agente que introduce una segunda marca al componente de molécula diana de los complejos de afinidad por aptámero. En una realización, la diana es una proteína o un péptido, y la diana se biotinila tratándola con NHS-PEO4-biotina. La segunda marca introducida a la molécula diana puede ser la misma o diferente de la marca de captura del aptámero. Si la segunda marca es la misma que la primera marca, o la marca de captura del aptámero, sitios de captura libres sobre el primer soporte sólido pueden bloquearse antes del inicio de esta etapa de marcado. En esta realización a modo de ejemplo, el primer soporte sólido se lava con biotina libre antes del inicio del marcado de dianas. Los métodos de marcado, y en particular, el marcado de dianas tales como péptidos y proteínas, se describen en detalle más adelante. En otras realizaciones, el marcado de la diana se realiza en cualquier otro momento en el ensayo antes del inicio de la separación de Captura 2 (obsérvese que si se usa el mismo resto de marca, la diana se marca después de que se realice la etapa de captura de la separación de Captura 1).

Entonces, la separación de Captura 1 se completa liberando los complejos de afinidad por aptámero del primer soporte sólido. En una realización, la primera marca separable es un resto fotoescindible que se escinde por irradiación con una lámpara de UV en condiciones que escinden $\geq$ aproximadamente el 90 % de la primera marca separable. En otras realizaciones, la liberación se lleva a cabo por el método apropiado para el resto separable seleccionado en la primera marca separable. Los complejos de afinidad por aptámero pueden eluirse y recogerse para uso adicional en el ensayo o pueden ponerse en contacto con otro soporte sólido para realizar las restantes etapas del ensayo descritas más adelante.

En una realización, la mezcla puede opcionalmente someterse a una exposición cinética. La exposición cinética ayuda a reducir cualquier unión no específica entre aptámeros y la molécula no diana. En una realización, se añade sulfato de dextrano 10 mM a los complejos de afinidad por aptámero, y la mezcla se incuba durante aproximadamente 15 minutos. En otra realización, la exposición cinética se inicia realizando la elución de Captura 1 en presencia de sulfato de dextrano 10 mM. En otras realizaciones, la exposición cinética se realiza después de la etapa de unión en equilibrio y antes de la separación de Captura 2. Estas y otras realizaciones de la exposición cinética se describen en más detalle más adelante.

En una realización, la separación de Captura 2 se realiza para eliminar el aptámero libre. Como se ha descrito anteriormente, en una realización, una segunda marca usada en la separación de Captura 2 puede añadirse a la diana mientras que el complejo de afinidad por aptámero está todavía en contacto con el soporte sólido usado en la separación de Captura 1. En otras realizaciones, la segunda marca puede añadirse a la diana en otro momento en el ensayo antes del inicio de la separación de Captura 2. La mezcla se pone entonces en contacto con un soporte sólido, teniendo el soporte sólido un elemento de captura adherido a su superficie que es capaz de unirse a la marca de captura diana, preferentemente con alta afinidad y especificidad. En una realización, el soporte sólido es perlas magnéticas (tales como DynaBeads MyOne Streptavidin C1) contenidas dentro de un pocillo de una placa de microtitulación y el elemento de captura es estreptavidina. Las perlas magnéticas proporcionan un método conveniente para la separación de componentes separados de la mezcla (estos y otros soportes sólidos y elementos de captura se describen en detalle más adelante). Así, los complejos de afinidad por aptámero contenidos en la mezcla se unen al soporte sólido mediante la interacción de unión de la marca de captura diana y el elemento de captura sobre el soporte sólido. El complejo de afinidad por aptámero se separa entonces del resto de la mezcla, por ejemplo, lavando el soporte para eliminar aptámeros no complejados. En una realización, el aptámero del complejo de afinidad por aptámero puede entonces liberarse para procesamiento adicional por uno o más de los siguientes tratamientos: sal alta, pH alto, pH bajo o temperatura elevada. Esta y otras separaciones de Captura 2 se describen en más detalle más adelante.

En otra realización, el aptámero liberado de la separación de Captura 2 se detecta y opcionalmente cuantifica por cualquier método de detección de ácidos nucleicos adecuado, tal como, por ejemplo, hibridación en chip de ADN, Q-PCR, espectroscopía de masas, y similares. Estos métodos de detección se describen en más detalle más adelante. En otra realización, el aptámero en el complejo de afinidad por aptámero se detecta y opcionalmente cuantifica mientras que todavía está en contacto con el soporte sólido. En una realización, el aptámero comprende un resto detectable para facilitar esta etapa de detección. El resto detectable se elige basándose en el método de detección que va a emplearse. En una realización, el resto detectable (etiqueta) se añade al aptámero durante la síntesis o antes del ensayo. En otra realización, el resto detectable se añade al aptámero tanto durante el ensayo como durante la detección. El aptámero detectado puede correlacionarse con la cantidad o concentración de la diana en la muestra de ensayo.

Ensayos de reticulación

Ensayo de reticulación de captura única (solo Captura 2)

En una realización, se realiza un ensayo de reticulación de captura única usando una separación de Captura 2. Este método funciona bien cuando la matriz de muestra no es muy compleja, de manera que otros componentes en la muestra no compiten por la marca. También funciona bien para muestras en las que la diana está presente en alto número de copias o concentración. En algunos casos, se proporciona beneficio adicional por el enlace covalente entre el fotoaptámero y la diana ya que puede permitir lavados más rigurosos en las etapas después de realizarse la reticulación.

Se proporcionan fotoaptámeros que tienen alta afinidad y especificidad por una molécula diana. En una realización, el resto de reticulación del fotoaptámero se une al aptámero mediante un conector escindible. En una realización, el grupo de reticulación es ANA (4-azido-2-nitro-anilina) y el grupo fotoescindible es PC Linker. En una realización, se usa la construcción de aptámero ilustrada en la FIG. 6C. Los fotoaptámeros se ponen en contacto con una muestra que puede contener moléculas diana para formar una mezcla que contiene el aptámero-la molécula diana, y opcionalmente molécula no diana. Donde la molécula diana está presente en la muestra, se forman complejos de (foto)afinidad por aptámero. La mezcla puede opcionalmente incubarse durante un periodo de tiempo suficiente para lograr la unión en equilibrio de los aptámeros y moléculas diana (por ejemplo, durante al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, o al menos aproximadamente 30 minutos).

En una realización, la mezcla puede opcionalmente someterse a una exposición cinética. La exposición cinética ayuda a reducir cualquier unión no específica entre los fotoaptámeros y la molécula no diana. En una realización, se añade sulfato de dextrano 10 mM y la mezcla se incuba durante aproximadamente 15 minutos. Esta y otras realizaciones de la exposición cinética se describen en más detalle más adelante.

Se convierten complejos de (foto)afinidad por aptámero en complejos covalentes de aptámero por irradiación con luz a la longitud de onda apropiada. Por ejemplo, puede usarse irradiación a aproximadamente 470 nM para reticular ANA que contiene fotoaptámeros con una proteína o péptido diana.

En una realización, la separación de Captura 2 se realiza para eliminar el fotoaptámero libre. En una realización, la mezcla que contiene el complejo covalente de aptámero se trata con un agente que introduce una marca de captura al componente de molécula diana de los complejos covalentes de aptámero. En otras realizaciones, la marca se introduce antes de que los aptámeros se pongan en contacto con la muestra de ensayo, antes de la unión en equilibrio o antes de la exposición cinética. En una realización, la diana es una proteína o un péptido, y se une una marca de biotina a la molécula diana mediante tratamiento con NHS-PEO4-biotina (este y otros métodos de marcado se describen en detalle más adelante). La mezcla se pone en contacto entonces con un soporte sólido, teniendo el soporte sólido un elemento de captura adherido a su superficie que es capaz de unirse a la marca de captura diana, preferentemente con alta afinidad y especificidad. En una realización, el soporte sólido es perlas magnéticas (tales como DynaBeads MyOne Streptavidin C1) contenidas dentro de un pocillo de una placa de microtitulación y el elemento de captura es estreptavidina. Las perlas magnéticas proporcionan un método conveniente para la separación de componentes separados de la mezcla (estos y otros soportes sólidos y elementos de captura se describen en detalle más adelante). Así, los complejos covalentes de aptámero contenidos en la mezcla se unen al soporte sólido mediante la interacción de unión de la marca de captura diana y el elemento de captura. El complejo covalente de aptámero se separa entonces del resto de la mezcla, por ejemplo, lavando el soporte para eliminar aptámeros no complejados. En una realización, el fotoaptámero del complejo covalente de aptámero puede entonces liberarse para procesamiento adicional por un método apropiado para el resto escindible. Por ejemplo, para escindir PC Linker, la mezcla se irradia con una lámpara de UV durante aproximadamente 20 minutos. Esta y otras separaciones de Captura 2 se describen en más detalle más adelante.

En otra realización, el fotoaptámero liberado de la separación de Captura 2 se detecta y opcionalmente cuantifica, por cualquier método de detección de ácidos nucleicos adecuado, tal como, por ejemplo, hibridación en chip de ADN, Q-PCR, espectroscopia de masas, y similares. Estos métodos de detección se describen en más detalle más adelante. En otra realización, el fotoaptámero en el complejo covalente de aptámero se detecta y opcionalmente cuantifica mientras que todavía está en contacto con el soporte sólido. El fotoaptámero detectado puede correlacionarse con la cantidad o concentración de diana en la muestra de ensayo original.

Ensayo de fotorreticulación por captura doble (Captura 1 y 2)

El ensayo de fotorreticulación por captura doble es similar al ensayo de fotorreticulación por captura única con la adición de una etapa de separación adicional. Esta etapa de separación adicional generalmente proporciona sensibilidad y especificidad adicionales.

Se proporcionan fotoaptámeros que tienen alta afinidad y especificidad por una molécula diana. En una realización, el resto de reticulación del fotoaptámero se une al aptámero mediante un conector escindible. En una realización, el grupo de reticulación es ANA (4-azido-2-nitro-anilina) y el grupo fotoescindible es PC Linker. En una realización, el

fotoaptámero también comprende una primera marca separable. En otra realización, la primera marca separable se añade en cualquier momento en el ensayo antes de la separación de Captura 1. En una realización, el resto de la primera marca separable es una biotina y el elemento separable es un conector de hibridación. En una realización, se usa la construcción de fotoaptámero ilustrada en la FIG. 6D. El fotoaptámero se pone en contacto con una muestra que puede contener moléculas diana para formar una mezcla que contiene el aptámero, la molécula diana, y opcionalmente molécula no diana. Donde la molécula diana está presente en la muestra, se forman complejos de afinidad por (foto)aptámero. La mezcla puede opcionalmente incubarse durante un periodo de tiempo suficiente para lograr la unión en equilibrio de los aptámeros y moléculas diana (por ejemplo, durante al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, o al menos aproximadamente 30 minutos).

En una realización, la mezcla puede opcionalmente someterse a una exposición cinética. La exposición cinética ayuda a reducir cualquier unión no específica entre los fotoaptámeros y la molécula no diana. En una realización particular, se añade sulfato de dextrano 10 mM y la mezcla se incuba durante aproximadamente 15 minutos. Esta y otras realizaciones de la exposición cinética se describen en más detalle más adelante.

Se convierten complejos de afinidad por (foto)aptámero en complejos covalentes de aptámero por irradiación con luz a la longitud de onda apropiada. Por ejemplo, puede usarse irradiación a aproximadamente 470 nM para reticular ANA que contiene fotoaptámeros con una proteína diana.

En una realización, se realiza la separación de Captura 1 para eliminar diana libre. La mezcla se pone en contacto con un primer soporte sólido que tiene un elemento de captura adherido a su superficie que es capaz de unirse a la marca de captura del aptámero, preferentemente con alta afinidad y especificidad. En una realización, la primera marca separable comprende un resto de marca que es a biotina, el primer soporte sólido es perlas de agarosa en una columna y el elemento de captura es estreptavidina. Por ejemplo, pueden usarse perlas de estreptavidina inmovilizadas de Pierce. Estos y otros soportes sólidos y elementos de captura se describen en detalle más adelante. Así, los complejos covalentes de aptámero contenidos en la mezcla se unen al primer soporte sólido mediante la interacción de unión de la primera marca separable y primer elemento de captura. Los complejos covalentes de aptámero se separan del resto de la mezcla, por ejemplo, lavando el primer soporte sólido para eliminar moléculas no unidas.

En una realización, los complejos covalentes de aptámero que siguen unidos al soporte sólido se tratan entonces con un agente que introduce una segunda marca al componente de molécula diana de los complejos de afinidad por aptámero, por ejemplo, biotilación de una molécula diana de proteína o péptido mediante tratamiento con NHS-PEO4-biotina. La segunda marca introducida a la molécula diana puede ser igual o diferente a la primera marca. Si la segunda marca es la misma que la primera marca, los sitios de captura libres sobre los primeros soportes sólidos pueden bloquearse antes del inicio de esta etapa de marcado. En una realización, el primer soporte sólido se lava con biotina libre antes del inicio del marcado de la diana. Los métodos de marcado, y en particular, el marcado de dianas tales como péptidos y proteínas, se describen en detalle más adelante. En otras realizaciones, el marcado de la diana se realiza en cualquier otro punto en el ensayo antes del inicio de la separación de Captura 2 (obsérvese que si se usa el mismo resto de marcado, la diana se marca después realizarse la etapa de captura de la separación de Captura 1).

Entonces, la separación de Captura 1 se completa liberando los complejos covalentes de aptámero del primer soporte sólido. En una realización, la primera marca separable se escinde tratando la mezcla con condiciones que alterarán el conector de hibridación, tales como pH alto. En una realización, se añade NaOH 20 mM a la mezcla. En otras realizaciones, la liberación del complejo covalente de aptámero se lleva a cabo por cualquier método que sea apropiado para el resto separable en la primera marca separable. Los complejos covalentes de aptámero pueden eluirse y recogerse para uso posterior en el ensayo o pueden ponerse en contacto con otro soporte sólido con el fin de realizar las restantes etapas del ensayo.

En una realización, la separación de Captura 2 se realiza para eliminar el fotoaptámero libre. La mezcla se pone en contacto con un soporte sólido que tiene un elemento de captura adherido a su superficie que es capaz de unirse a la segunda marca de captura, preferentemente con alta afinidad y especificidad. En una realización, el soporte sólido es perlas magnéticas (tales como DynaBeads MyOne Streptavidin C1) contenidas dentro de un pocillo de una placa de microtitulación y el elemento de captura es estreptavidina. Las perlas magnéticas proporcionan un método conveniente para la separación de componentes separados de la mezcla (estos y otros soportes sólidos y elementos de captura se describen en detalle más adelante). Así, los complejos covalentes de aptámero contenidos en la mezcla se unen al soporte sólido mediante la interacción de unión de la marca de captura diana y el elemento de captura. El complejo covalente de aptámero se separa entonces del resto de la mezcla, por ejemplo, lavando el soporte para eliminar aptámeros no complejados. En una realización, el fotoaptámero del complejo covalente de aptámero puede entonces liberarse para procesamiento adicional por un método apropiado para el resto escindible. Por ejemplo, para escindir PC Linker, la mezcla se irradia con una lámpara de UV durante aproximadamente 20 minutos. Esta y otras separaciones de Captura 2 se describen en más detalle más adelante.

En otra realización, el fotoaptámero liberado de la separación de Captura 2 se detecta y opcionalmente cuantifica por cualquier método de detección de ácidos nucleicos adecuado, tal como, por ejemplo, hibridación en chip de

ADN, Q-PRC, espectroscopía de masas, y similares. Estos métodos de detección se describen en más detalle más adelante. En otra realización, el fotoaptámero en el complejo covalente de aptámero se detecta y opcionalmente cuantifica mientras que todavía está en contacto con el soporte sólido. El fotoaptámero detectado puede correlacionarse con la cantidad o concentración de diana en la muestra de ensayo original.

5

Variaciones

Variaciones: Conjunto de dilución

10 En cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la muestra de ensayo puede prepararse como dos o más diluciones de la muestra de ensayo, que puede aumentar el intervalo dinámico de la detección de diana por los métodos desvelados en el presente documento. Las muestras de ensayo de dilución individuales se ensayan por separado hasta e incluyendo la formación de complejos de aptámero (o covalentes), después de lo cual las muestras de ensayo de dilución pueden reunirse para el resto del ensayo y detectarse simultáneamente en un único soporte sólido. En una realización, cada muestra de ensayo de dilución incluye un único aptámero, permitiendo así una única medición de la diana correspondiente. En otra realización, puede añadirse un aptámero a dos o más diluciones, poniendo cada dilución en contacto un aptámero marcado de forma distinta para una diana particular, permitiendo la detección de una señal de aptámero específica para cada una de las diferentes muestras de dilución en un único soporte sólido. Encadenando juntas muestras diluidas de este modo puede extenderse el intervalo dinámico para una única molécula diana con respecto a muchos órdenes de magnitud y añadir exactitud cuando las regiones de solapamiento de cuantificación conduzcan a múltiples determinaciones de una única concentración de diana.

25 En otra realización, el ensayo se realiza como se ha expuesto resumidamente anteriormente, hasta e incluyendo la etapa donde las perlas se suspenden después de desechar el sobrenadante que contiene diana y muestra de ensayo sin complejar. Antes de eluir el aptámero libre y complejo de aptámero (o covalente) de las perlas, el complejo de aptámero (o covalente) puede ponerse en contacto con un agente de marcado, seguido de sedimentación y lavado repetidos para eliminar el agente de marcado no reactivo antes de poner en contacto el soporte sólido con el complejo de aptámero (o covalente) para la detección y/o cuantificación de la molécula diana.

30 En una realización, se prepara un conjunto de muestras de ensayo como diluciones sucesivas a las que se introduce un aptámero marcado (o fotoaptámero marcado) con una afinidad específica por una molécula diana. Puede añadirse el mismo aptámero con una marca diferente a cada dilución de muestra de ensayo. Como se ha descrito adicionalmente en el presente documento, tras la formación de un complejo de afinidad por aptámero (o la conversión opcional en un complejo covalente de aptámero), las muestras de ensayo individuales pueden reunirse y ponerse en contacto con un agente de marcado tanto antes como después de la unión del complejo de aptámero (o covalente) al soporte sólido. La molécula diana, si está presente en la muestra de ensayo, se detecta y/o cuantifica detectando el agente de marcado en el complejo de aptámero (o covalente). Las señales resultantes detectadas para cada aptámero que tienen una marca diferente pueden combinarse para cuantificar con exactitud la cantidad o concentración de la molécula diana en la muestra de ensayo originales. Por ejemplo, la primera dilución puede producir una señal máxima para la diana, dando solo información semi-cuantitativa, mientras que la segunda dilución puede producir una señal que es inferior a la saturación, permitiendo una cuantificación precisa de la diana en las muestras de ensayo originales.

45 En otra realización, se prepara un conjunto de muestras de ensayo como diluciones sucesivas a las que se introduce un aptámero marcado (o fotoaptámero marcado) con una afinidad específica por una molécula diana. Pueden añadirse diferentes aptámeros que tienen marcas únicas a cada dilución de muestra. Como se ha descrito adicionalmente en el presente documento, tras la formación de complejos de afinidad por aptámero (o la conversión opcional en complejos covalentes de aptámero), las muestras de ensayo individuales pueden reunirse y ponerse en contacto con un agente de marcado tanto antes como después de la unión de los complejos de aptámero (o covalentes) al soporte sólido. Las moléculas diana presentes en la muestra de ensayo se detectan y/o cuantifican detectando el agente de marcado en el complejo de aptámero (o covalente). Las señales resultantes pueden cuantificarse para intervalos de diana con respecto a muchos órdenes de magnitud dependiendo de las diferentes diluciones sucesivas de la muestra original.

55

Variación: Muestra de referencia

60 En cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, una muestra de ensayo puede compararse con una muestra de referencia. Una "muestra de referencia" se refiere en el presente documento a cualquier material, solución o mezcla que contiene una pluralidad de moléculas y que se sabe que incluye al menos una molécula diana. La cantidad o concentración precisa de cualquier molécula diana presente en la muestra de referencia también puede ser conocida. El término muestra de referencia incluye muestras biológicas, como se define en el presente documento, y muestras que pueden usarse para ensayos ambientales o toxicológicos, tales como, por ejemplo, agua contaminada o posiblemente contaminada y efluentes industriales. Una muestra de referencia también puede ser un producto final, producto intermedio o subproducto de un proceso de preparación, por ejemplo, un proceso de fabricación. Una muestra de referencia puede incluir cualquier medio de ensayo, tampón o diluyente

65

adecuado que se haya añadido a un material, solución o mezcla obtenida de un organismo o de alguna otra fuente (por ejemplo, el entorno o una fuente industrial).

En una realización, se preparan aptámeros con dos sondas diferentes. Por ejemplo, un aptámero puede tener un colorante CY3 y el otro el colorante CY5. Usando el ensayo de reticulación por captura doble como ejemplo, la muestra de referencia se expone a un aptámero y la muestra de ensayo al otro. Cada muestra se trata por separado de un modo idéntico hasta e incluyendo la etapa de reticulación. Después de la reticulación, las muestras pueden mezclarse igualmente y pueden llevarse a cabo las etapas restantes del ensayo. Es posible una comparación directa de cualquier expresión diferencial (es decir, cantidad o concentración diferencial de la diana en las muestras) entre la muestra de referencia y la muestra de ensayo midiendo la señal de cada agente de marcado por separado. Debe entenderse que este método puede incorporarse en cualquiera de los otros ensayos descritos en el presente documento. Además, además de usar diferentes colorantes, que incluye el uso de colorantes fluorescentes, pueden emplearse otras marcas o etiquetas para diferenciar la señal de cada uno de los diferentes aptámeros. Por ejemplo, en otra realización, los aptámeros usados en cada una de las muestras pueden tener diferentes marcas de secuencia. Este método es útil, por ejemplo, cuando la lectura es Q-PCR o matrices de hibridación de ADN.

En una realización, la muestra de referencia puede ser una muestra biológica reunida que representa un grupo de control. En otra realización, la muestra de referencia puede ser una muestra biológica obtenida de un individuo, recogida en un primer momento, y la muestra de ensayo puede obtenerse del mismo individuo, pero recogida en un segundo momento, facilitando así un estudio longitudinal de un individuo midiendo y evaluando cualquier cambio en la cantidad o concentración de una o más moléculas diana en múltiples muestras biológicas proporcionadas por el individuo con el tiempo.

Variación: Múltiple

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede usarse para realizar un análisis múltiple de una muestra de ensayo. Cualquier análisis múltiple tal 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, por ejemplo, una muestra biológica. En estas realizaciones, una pluralidad de aptámeros (o fotoaptámero marcados, cada uno de los cuales reconoce y opcionalmente se reticula con un analito diferente), se introduce en la muestra de ensayo y puede realizarse cualquiera de los ensayos anteriormente descritos. Después de liberar los aptámeros, puede emplearse cualquier método de detección de ácidos nucleicos múltiple adecuado para medir los diferentes aptámeros que han sido liberados. En una realización, esto puede llevarse a cabo por hibridación con sondas complementarias que están dispuestas por separado sobre una superficie sólida. En otra realización, cada uno de los diferentes aptámeros puede detectarse basándose en el peso molecular usando espectroscopía de masas. En otra realización más, cada uno de los diferentes aptámeros puede detectarse basándose en una movilidad electroforética, tal como, por ejemplo, en electroforesis capilar, en un gel, o por cromatografía de líquidos. En otra realización, pueden usarse sondas de PCR únicas para cuantificar cada uno de los diferentes aptámeros usando Q-PCR. En otra realización, cada uno de los diferentes aptámeros puede detectarse basándose en el peso molecular usando espectroscopía de masas.

Variación: Preincubación con competidor

En cada uno de los ensayos desvelados en el presente documento, se usa una exposición cinética para aumentar la especificidad del ensayo y para reducir la unión no específica. En una realización, que puede opcionalmente emplearse en cada uno de los ensayos descritos en el presente documento, puede llevarse a cabo reducción adicional en la unión no específica por tanto preincubación de un competidor con la muestra de ensayo como mediante la adición de un competidor a la mezcla durante la unión en equilibrio. En una realización, se preincuba 4 μM de un oligonucleótido competidor Z-Block (5'-(ACZZ)₂₈AC-3', donde Z = 5-bencil-dUTP) durante aproximadamente 5 minutos con la mezcla del texto.

Kits

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 potenciar la versatilidad de los métodos desvelados, los reactivos pueden proporcionarse en combinación envasada, en el mismo recipiente o recipientes separados, de manera que la relación de los reactivos proporcione optimización sustancial del método y ensayo. Los reactivos pueden cada uno estar en recipientes separados o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos.

Un kit comprende, en combinación envasada, al menos un aptámero marcado y uno o más soportes sólidos, cada uno que incluye al menos un agente de captura. El kit también puede incluir soluciones de lavado tales como medio acuoso tamponado para la dilución de muestra, además del lavado de matrices, reactivos de preparación de muestras, etc. El kit puede contener adicionalmente reactivos útiles en la introducción de una segunda marca, generalmente a través de la modificación de la diana. Además, el kit puede contener reactivos adecuados para realizar la exposición cinética deseada durante el método analítico. Las cantidades relativas de los diversos

reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que sustancialmente optimizan las reacciones que necesitan producirse durante el ensayo y que adicionalmente optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Bajo circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit puede proporcionarse como un polvo seco, normalmente liofilizado, que incluye excipientes, que tras la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo según la presente divulgación. El kit puede incluir adicionalmente una descripción escrita de un método según cualquiera de los métodos que se describe en el presente documento.

En una realización, 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 una marca; y un soporte sólido, en el que el soporte sólido incluye al menos un agente de captura dispuesto encima, y en el que el elemento de captura es capaz de asociarse a la marca en el aptámero.

En otra realización, 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 una marca y una etiqueta; y un soporte sólido, en el que el soporte sólido incluye al menos un agente de captura dispuesto encima, y en el que el elemento de captura es capaz de asociarse a la marca en el aptámero.

En otra realización, 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 una marca separable y una etiqueta; y un soporte sólido, en el que el soporte sólido incluye al menos un agente de captura dispuesto encima, y en el que el elemento de captura es capaz de asociarse a la marca en el aptámero.

Además, cualquiera de los kits anteriormente descritos puede contener reactivos y materiales para la realización de una exposición cinética durante el método de detección del kit.

Métodos

I. Oligonucleótidos

Oligonucleótidos: Bases modificadas

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan indistintamente para referirse a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud, y tales nucleótidos pueden incluir desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o análogos o desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos químicamente modificados. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" incluyen moléculas bi- o monocatenarias, además de moléculas de triple hélice.

Si están presentes, las modificaciones químicas de un nucleótido pueden incluir, individualmente o en cualquier combinación, modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones de piridina en la posición 5 (por ejemplo, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-[2-(1H-indol-3il)etil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(imidazoliletíl)-2'-desoxiuridina y 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina), modificaciones de purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo- o 5-yodo-uracilo, modificaciones del esqueleto, metilaciones, combinaciones de apareamientos de bases poco usuales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como terminaciones. Otras modificaciones pueden incluir la sustitución de uno o más de los nucleótidos que existen de forma natural con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y aquellos con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, y aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presentes en un azúcar puede sustituirse por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse por cualquier grupo protector adecuado; o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH de los extremos 5' y 3' pueden estar fosforilados o sustituidos con aminas, restos de grupos de terminación orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o restos de grupos de terminación orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 polímeros de polietilenglicol (PEG) u otros polímeros biológicos o sintéticos hidrófilos o hidrófobos. Si está presente, una modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje de un polímero. Una secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede ser adicionalmente modificado después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marca.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidas en la técnica, que incluyen 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil-ribósido. Como se observa anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse por 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 sin sustituir que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, como pueden las estructuras de esqueleto alternativas como, por ejemplo, un esqueleto de poliamida.

En una realización, las construcciones de aptámero pueden incluir uno o más nucleótidos en C5 modificados en la región variable del aptámero que ralentiza eficazmente la tasa de disociación del aptámero de su diana. Se ha mostrado que las modificaciones de bases de los nucleótidos usadas en la producción de la región variable del aptámero producen aptámeros que tienen constantes de disociación muy lentas de sus dianas respectivas. Por ejemplo, hay evidencia de que un aptámero que contiene pirimidinas modificadas en la posición 5, tales como cualquiera de aquellas ilustradas en la FIG. 16, tiene una constante de disociación lenta de su diana. En algunas realizaciones, el uso de un aptámero que incluye nucleótidos que han sido modificados de este modo en un método de ensayo que incluye una exposición cinética da sensibilidad y especificidad potenciadas en la detección de una diana. Como se indica en la FIG. 5, se han producido aptámeros de más de 500 dianas hasta la fecha. Muchos de estos aptámeros tienen características de constante de disociación lenta.

En una realización, la región variable del aptámero incluye nucleótidos que tienen bases modificadas. Estos aptámeros pueden usarse en cualquiera de los métodos, dispositivos y kits descritos en el presente documento. Hay evidencia de que estos nucleótidos modificados pueden conducir a la identificación de aptámeros que tienen constantes de disociación muy lentas de su diana respectiva mientras que mantienen la alta afinidad por la diana. En una realización, puede modificarse la posición C-5 de las bases de pirimidina. En otras realizaciones, algunas o todas de las purinas o pirimidinas en el aptámero pueden ser los nucleótidos modificados en la base. En todavía otras realizaciones, también pueden usarse combinaciones de tanto purinas modificadas como pirimidinas modificadas. Los aptámeros que contienen nucleótidos con bases modificadas tienen varias propiedades que son diferentes de los aptámeros que contienen solo nucleótidos no modificados (es decir, nucleótidos que existen de forma natural). En una realización, el método para la modificación de los nucleótidos es a través de un enlace carboxiamida. Sin embargo, pueden ser adecuados otros métodos para la modificación. Se ha observado sorprendentemente que la estructura de los aptámeros de constante de disociación lenta identificados no parece adaptarse a las estructuras predichas por los modelos de apareamiento de bases. Esto está soportado por el hecho de que las temperaturas de fusión medidas de los aptámeros no son las que los modelos pueden predecir. Como se muestra en el presente documento, parece haber poca o ninguna correlación entre las temperaturas de fusión medidas y predichas. Además, en promedio, la T_m calculada es 6 °C más baja que la T_m medida. Las temperaturas de fusión medidas indican que los aptámeros que incluyen estos nucleótidos modificados son más estables que lo que puede predecirse y posiblemente poseen estructuras secundarias novedosas. También es más probable la identificación de aptámeros de constante de disociación lenta cuando los nucleótidos modificados se usan en la producción de la biblioteca inicial o mezcla de candidatos.

Modificaciones de piridina en la posición 5 particulares incluyen aquellas descritas en las patentes de EE.UU. 5.719.273 y 5.945.527, específicamente aquellas mostradas en la FIG. 19. Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico modificado" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que contiene uno o más nucleótidos modificados que son compatibles con el proceso SELEX.

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un complejo no covalente de un aptámero y una diana, en el que el aptámero tiene una K_d por la diana de aproximadamente 100 nM o menos, en el que la tasa de disociación (t_{1/2}) del aptámero de la diana es mayor o igual a aproximadamente 30 minutos, y en el que una, varias o todas las pirimidinas en la secuencia de ácidos nucleicos del aptámero están modificadas en la posición 5 de la base. Las modificaciones pueden seleccionarse del grupo de compuestos mostrados en la FIG. 19. Los aptámeros pueden diseñarse con cualquier combinación de los nucleótidos modificados en la base deseados.

II. SELEX y aptámero

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 del grado; sin embargo, en este contexto, la "afinidad de unión específica" de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana generalmente con un grado de afinidad mucho más alto que con el que se une a otros componentes en una muestra de ensayo. Un "aptámero" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. "Aptámeros" se refiere a más de

un conjunto tal de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener tanto los mismos números como diferentes 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 ha describe adicionalmente más adelante, un aptámero puede incluir una marca. Si un aptámero incluye una marca, todas las copias del aptámero no necesitan tener la misma marca. Además, si diferentes aptámeros incluyen cada uno una marca, estos aptámeros diferentes puede tener tanto la misma marca como una marca diferente.

Un aptámero puede identificarse usando cualquier método conocido, que incluye el proceso SELEX. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands". Una vez identificado, un aptámero puede prepararse o sintetizarse según cualquier método conocido, que incluye métodos sintéticos químicos y métodos sintéticos enzimáticos.

Los términos "SELEX" y "proceso SELEX" se usan indistintamente en el presente documento para referirse generalmente a una combinación de (1) la selección de ácidos nucleicos que interaccionan con una molécula diana de una manera deseable, por ejemplo, unión con alta afinidad a una proteína, con (2) la amplificación de aquellos ácidos nucleicos seleccionados. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands". El proceso SELEX puede usarse para generar un aptámero que se une covalentemente a su diana, además de un aptámero que se une no covalentemente a su diana. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.705.337 titulada "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX". El proceso SELEX también puede usarse para generar aptámeros con constantes de disociación mejoradas como se describe en el documento US2009/0004667 titulado "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates".

Como se usa en el presente documento, el término "complejo de afinidad por aptámero" o "complejo 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 por aptámero" o "complejo de aptámero" es un conjunto de copias de un tipo o especie de complejo formado por un aptámero unido a su molécula diana correspondiente. "Complejos de afinidad por aptámero" o "complejos de aptámero" se refieren a más de un conjunto tal de complejos. Un complejo de afinidad por aptámero o complejo de aptámero puede generalmente invertirse o disociarse por un cambio en una condición ambiental, por ejemplo, un aumento en la temperatura, un aumento en la concentración de sales, o una adición de un desnaturante.

Como se usa en el presente documento, "complejo no específico" se refiere a una asociación no covalente entre dos o más moléculas distintas de un aptámero y su molécula diana. Debido a 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, en promedio, afinidades mucho más bajas entre sí y tendrán una constante de disociación correspondientemente más alta 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.

El proceso SELEX generalmente empieza con la preparación de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos de secuencia diferente. La mezcla de candidatos generalmente incluye secuencias de ácidos nucleicos que incluyen dos regiones fijas (es decir, cada uno de los miembros de la mezcla de candidatos contiene las mismas secuencias en la misma localización) y una región variable. Normalmente, las regiones de secuencia fija se seleccionan de forma que ayuden en las etapas de amplificación descritas más adelante, o potencien el potencial de una disposición estructural dada de los ácidos nucleicos en la mezcla de candidatos. La región variable normalmente proporciona la región de unión diana de cada ácido nucleico en la mezcla de candidatos, y esta región variable puede ser completamente al azar (es decir, siendo la probabilidad de hallazgo de una base en cualquier posición una de entre cuatro) o solo parcialmente al azar (por ejemplo, la probabilidad de hallazgo de una base en cualquier localización puede seleccionarse en cualquier nivel entre el 0 y el 100 por ciento). La mezcla de candidatos preparada se pone en contacto con la diana seleccionada en condiciones que son favorables para que se produzca la unión entre la diana y los miembros de la mezcla de candidatos. Bajo estas condiciones, la interacción entre la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos generalmente forma pares ácido nucleico-diana que tienen la afinidad relativa más fuerte entre los miembros del par. Los ácidos nucleicos con la mayor afinidad por la diana se separaron de aquellos ácidos nucleicos con la menor afinidad por la diana. El proceso de separación se realiza de un modo que se retenga el máximo número de candidatos de alta afinidad. Aquellos ácidos nucleicos seleccionados durante la separación por tener una afinidad relativamente alta por la diana se amplifican para crear una nueva mezcla de candidatos que está enriquecida en ácidos nucleicos que tienen una afinidad relativamente alta por la diana. Repitiendo las etapas de separación y de amplificación anteriores, la mezcla de candidatos recién formada contiene cada vez menos secuencias únicas, y generalmente aumentará el grado de afinidad promedio de la mezcla de ácidos nucleicos por la diana. Llevado a su extremo, el proceso SELEX dará una mezcla de candidatos que contiene uno o un número muy pequeño de ácidos nucleicos únicos que representan aquellos ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos original que tiene la mayor afinidad por la molécula diana.

III. FotoSELEX

Definición de fotoaptámero

5 Métodos de reticulación

Como se usa en el presente documento, "fotoaptámero", "ligando de ácido nucleico fotorreactivo" y "aptámero fotorreactivo" se usan indistintamente para referirse a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que pueden unirse covalentemente con o "reticularse" con una molécula diana. Por ejemplo, puede modificarse un resto de ácido nucleico que existe de forma natural para incluir un grupo funcional químico que confiere fotorreactividad al resto de ácidos nucleicos tras la exposición a una fuente de radiación de una longitud de onda apropiada. Un fotoaptámero puede identificarse y/o prepararse usando cualquier método conocido. En algunas realizaciones, un aptámero fotorreactivo se identifica usando el proceso fotoSELEX. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.763.177, la patente de EE.UU. N.º 6.001.577 y la patente de EE.UU. N.º 6.291.184, cada una de las cuales se titula "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"; véase, por tanto, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands" y el documento US2009/0098549 titulado "Improved SELEX and PHOTOSELEX".

Grupos funcionales fotorreactivos a modo de ejemplo que pueden incorporarse en 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-azyodoguanina, 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 nucleósido a modo de ejemplo, puede usarse otros grupos funcionales fotorreactivos que pueden añadirse a un extremo terminal de un aptámero mediante una molécula de conector apropiada. Tales grupos funcionales fotorreactivos incluyen benzofenona, antraquinona, 4-azido-2-nitro-anilina, psoraleno, derivados de cualquiera de estos, y similares.

Un grupo funcional fotorreactivo incorporado en un fotoaptámero puede activarse por cualquier método adecuado. En una realización, un fotoaptámero que contiene un grupo funcional fotorreactivo se reticula con su diana exponiendo el complejo de afinidad por fotoaptámero a una fuente de radiación electromagnética. Tipos adecuados de radiación electromagnética incluyen luz ultravioleta, luz visible, rayos X y rayos gamma. Fuentes de radiación adecuadas incluyen fuentes que utilizan tanto luz monocromática como luz policromática filtrada.

Como se usa en el presente documento, el término "complejo covalente de aptámero" se refiere a un complejo de afinidad por aptámero en el que el aptámero ha sido inducido para formar o de otro modo forma un enlace covalente con su molécula diana. Un "complejo covalente de aptámero" es un conjunto de copias de un tipo o especie de complejo formado por un aptámero covalentemente unido a su molécula diana correspondiente. "Complejos covalentes de aptámero" se refiere a más de un conjunto tal de complejos. Un enlace covalente o enlace entre un aptámero y su molécula diana puede inducirse por fotoactivación de un resto químico en el aptámero, que incluye aquellos restos descritos anteriormente con respecto a fotoaptámeros. Un enlace covalente o enlace entre un aptámero y su molécula diana también puede inducirse químicamente. Grupos químicos que pueden incluirse en un aptámero y usarse para inducir un enlace covalente con la diana incluyen, pero no se limitan a, aldehídos, maleimidas, derivados de acrililo, derivados de diazonio, tioles, etc. En algunas realizaciones, grupos de reticulación química, tales como maleimida o sales de diazonio, por ejemplo, pueden convertir complejos de afinidad por aptámero en complejos covalentes de aptámero simplemente proporcionando el entorno y yuxtaposición apropiados de grupos reactivos requeridos para que se produzca la reactividad química específica y suficientemente potenciada. En otras realizaciones, reticulantes químicos, tales como grupos aldehído, pueden requerir la adición de otro componente, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio, para convertir los complejos de afinidad por aptámero en complejos covalentes de aptámero irreversibles estables. En todavía otras realizaciones, ninguno de tales reticulantes químicos está incluido en un aptámero; más bien, se usa un tercer reactivo para convertir un complejo de afinidad por aptámero en un complejo covalente de aptámero facilitando una unión covalente entre el aptámero y su diana. Por ejemplo, un reactivo homo- o hetero-bifuncional que contiene tanto un resto reactivo con amina (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimidilo, un aldehído, o un imidato) como un grupo reactivo con nucleósido (por ejemplo, una yodoacetamida o un aldehído activado) pueden inducir la complejación covalente de un complejo de afinidad por aptámero, tal como un complejo de afinidad formado por un aptámero y una proteína diana.

Los fotoaptámeros pueden identificarse identificando primero un aptámero de afinidad y sustituyendo en uno o más restos de nucleótidos fotorreactivos. Alternativamente, los fotoaptámeros pueden identificarse por un proceso SELEX que comprende lo siguiente: (a) preparar una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos, en la que cada ácido nucleico comprende (i) al menos una pirimidina marcadora de posición no fotorreactiva y (ii) al menos una pirimidina modificada; (b) poner en contacto la mezcla de candidatos con una diana, en la que ácidos nucleicos que

tienen una elevada afinidad por la diana con respecto a la mezcla de candidatos pueden separarse del resto de la mezcla de candidatos; (c) separar los ácidos nucleicos de afinidad elevada del resto de la mezcla de candidatos; (d) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad elevada para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligando de ácido nucleico, por lo que puede identificarse un aptámero para el compuesto diana; (e) repetir (b)-(d) según se desee; (f) producir un fotoaptámero candidato reemplazando en cada ácido nucleico de la mezcla enriquecida en ligando de ácido nucleico de (d) una o más pirimidinas marcadoras de posición no fotorreactivas con una pirimidina fotorreactiva; (g) poner en contacto el fotoaptámero candidato con la diana en el que se forma un complejo de fotoaptámero-diana candidato; (h) irradiar dicho complejo de fotoaptámero-diana candidato; (i) determinar si dicho complejo de fotoaptámero-diana candidato se ha fotorreticulado; (j) repetir (f)-(i) según se desee; y (k) identificar al menos un fotoaptámero para la diana.

IV. Muestra de ensayo y molécula diana

El término "muestra de ensayo" se refiere en el presente documento a cualquier material, solución o mezcla que contenga una pluralidad de moléculas y puede incluir al menos una molécula diana. El término muestra de ensayo incluye muestras biológicas, como se define más adelante, y muestras que pueden usarse para ensayos ambientales o toxicológicos, tales como, por ejemplo, agua contaminada o posiblemente contaminada y efluentes industriales. Una muestra de ensayo también puede ser un producto final, producto intermedio o subproducto de un proceso de preparación, por ejemplo, un proceso de fabricación. Una muestra de ensayo puede incluir cualquier medio de ensayo, tampón o diluyente adecuado que se haya añadido a un material, solución o mezcla obtenida de un organismo o de alguna otra fuente (por ejemplo, el entorno o una fuente industrial).

El término "muestra biológica" se refiere a cualquier material, solución o mezcla obtenida de un organismo. Ésta incluye sangre (incluyendo sangre completa, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma y suero), esputo, aliento, orina, semen, saliva, líquido meníngeo, líquido amniótico, líquido glandular, líquido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado de articulación, células, un extracto celular y líquido cefalorraquídeo. Ésta también incluye fracciones experimentalmente separadas de todos los precedentes. El término "muestra biológica" también incluye materiales, soluciones o mezclas que contienen material sólido homogeneizado, tal como, por ejemplo, de una muestra de heces, una muestra de tejido, o una biopsia de tejido. El término "muestra biológica" también incluye materiales, soluciones o mezclas derivadas de un cultivo de tejido, cultivo celular, cultivo bacteriano o cultivo viral.

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 molécula particular, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marca que no altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. "Moléculas diana" o "dianas" se refiere a más de un conjunto tal de moléculas. Moléculas diana a modo de ejemplo incluyen proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, polisacáridos, glucoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, affibodies, miméticos de anticuerpos, virus, patógenos, sustancias tóxicas, sustratos, metabolitos, análogos del estado de transición, cofactores, inhibidores, fármacos, colorantes, nutrientes, factores de crecimiento, células, tejidos, y cualquier fragmento o porción de cualquiera de los anteriores. Un aptámero puede identificarse para prácticamente cualquier molécula química o biológica de cualquier tamaño, y así prácticamente cualquier molécula química o biológica de cualquier tamaño puede ser una diana adecuada. Una diana también puede modificarse para potenciar la verosimilitud o intensidad de una interacción entre la diana y el aptámero. Una diana también puede modificarse para incluir una marca, como se ha definido anteriormente. En realizaciones a modo de ejemplo, la molécula diana es una proteína. Véase la patente de EE.UU. N.º 6.376.190 titulada "Modified SELEX Processes Without Purified Protein" para métodos en los que la diana SELEX es un péptido.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marca. También están incluidos dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), además de otras modificaciones conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden ser cadenas individuales o cadenas asociadas.

Como se usa 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 especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. "Molécula no diana" o "no dianas" se refieren a más de un conjunto tal de moléculas. Se apreciará que una molécula que es una no diana para un primer aptámero puede ser

una diana para un segundo aptámero. Asimismo, una molécula que es una diana para el primer aptámero puede ser una no diana para el segundo aptámero.

V: Captura 1 – Separación basada en aptámero

Como se usa en el presente documento, el término "separación" se refiere a una separación o eliminación de una o más especies moleculares de la muestra de ensayo. La separación puede usarse para aumentar la sensibilidad y/o reducir el nivel de fondo. La separación es más eficaz tras la formación de complejos de aptámero (o covalentes) o cuando el complejo de afinidad por aptámero llega a ser irreversible debido al enlace covalente introducido durante la reticulación. Puede introducirse una etapa de separación después de cualquier etapa, o después de cada etapa, donde el complejo de afinidad por aptámero se inmoviliza. La separación puede también basarse en un diferencial de tamaño u otra propiedad específica que exista diferencialmente entre el complejo de afinidad por aptámero y otros componentes de la muestra de ensayo. La separación también puede lograrse mediante una interacción específica con un aptámero o diana. La separación también puede llevarse a cabo basándose en las propiedades físicas o bioquímicas del aptámero, diana, complejo de afinidad por aptámero o complejo covalente de aptámero

Como se usa en el presente documento, "Captura 1" se refiere a la separación de un complejo de afinidad por aptámero o complejo covalente de aptámero basándose en la captura del aptámero. El fin de la etapa de Captura 1 es eliminar sustancialmente todos los componentes en la muestra de ensayo que no estén asociados al aptámero. La eliminación de la mayoría de tales componentes generalmente mejorará la eficiencia del marcado de diana, eliminando molécula no diana de la etapa de marcado de diana usada para la captura Captura 2 y puede conducir a nivel de fondo del ensayo más bajo. En una realización, una marca se une al aptámero tanto antes del ensayo, durante la preparación del ensayo, como durante el ensayo añadiendo la marca al aptámero. En una realización, la marca es una marca separable. En una realización, la marca separable comprende un conector escindible y una marca. Como se ha descrito anteriormente, el aptámero marcado puede ser capturado sobre un soporte sólido donde el soporte sólido comprende un elemento de captura apropiado para la marca. Después, el soporte sólido puede lavarse para eliminar cualquier material en la mezcla de ensayo que no esté asociado al aptámero.

En diversas realizaciones, los complejos de afinidad por aptámero (o covalentes) se capturan o inmovilizan sobre el soporte sólido usando la marca de captura incorporada en el aptámero (marca de aptámero). Por ejemplo, si la marca de captura sobre el aptámero es biotina, como se ha descrito anteriormente, pueden usarse perlas que tienen avidina, estreptavidina, neutravidina, extravidina, y similares, sobre la superficie para capturar los complejos de afinidad por aptámero (o covalentes). Las perlas se lavan para eliminar cualquier diana libre (sin complejar) y otros componentes de la matriz de muestra.

En otra realización, la marca es una marca de hibridación complementaria a una sonda inmovilizada sobre el primer soporte sólido. El soporte sólido en este caso puede incluir microperlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas), cualquier otro soporte sólido adecuado descrito en el presente documento, y similares. La marca de hibridación puede ser una marca de secuencia única añadida al aptámero o puede ser una porción de la secuencia del aptámero o puede ser la secuencia del aptámero entera. Después de que el aptámero se asocie con el soporte sólido mediante hibridación, la muestra de ensayo puede lavarse para eliminar cualquier material que no esté asociado al aptámero. En una realización, los complejos covalentes de aptámero y el aptámero libre pueden ser liberados del soporte sólido usando cualquier método adecuado para hibridación inversa, tal como sal alta, pH bajo o alto, alta temperatura o una combinación de cualquiera de estos. La liberación de una marca de hibridación en Captura 1 generalmente no es compatible con la preservación de complejos de afinidad por aptámero, ya que las condiciones que conducen a la alteración de la hibridación marca-sonda generalmente conducirán a la desnaturalización de la estructura del aptámero, produciendo la disociación del complejo de afinidad por aptámero.

En otra realización, la eliminación de componentes no asociados al aptámero puede llevarse a cabo usando técnicas físicas en vez de una marca de aptámero explícita y un primer soporte sólido. En una realización, esto se lleva a cabo precipitando el aptámero, tanto libre como complejo, en la muestra de ensayo, dejando otras moléculas que pueden reaccionar con el agente de marcado de diana en el sobrenadante que va a desecharse. Obsérvese que este método se diseña para su uso con los ensayos de fotorreticulación. Tal precipitación del ácido nucleico puede llevarse a cabo con reactivos que incluyen bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), y disolventes orgánicos tales como etanol, por ejemplo.

VI: Captura 2 – Separación basada en proteína

Como se usa en el presente documento, "Captura 2" se refiere a la separación de un complejo de afinidad por aptámero o complejo covalente de aptámero basándose en la captura de la molécula diana. El fin de la etapa de Captura 2 es eliminar aptámero libre, o sin complejar, de la muestra de ensayo antes de la detección y cuantificación opcional. El eliminar el aptámero libre de la muestra permite la detección de la afinidad del aptámero o complejos covalentes de aptámero por cualquier técnica de detección de ácidos nucleicos adecuada. Si se usa Q-PCR para la detección y cuantificación opcional, se necesita la eliminación del aptámero libre para la detección y cuantificación precisa de la molécula diana.

En una realización, la molécula diana es una proteína o péptido y el aptámero libre se separa del complejo de afinidad por aptámero (o covalente) (y el resto de la muestra de ensayo) usando reactivos que pueden incorporarse en proteínas (y péptidos) y complejos que incluyen proteínas (o péptidos), tales como, por ejemplo, un complejo de afinidad por aptámero (o covalente). La proteína marcada (o péptido) y el complejo de afinidad por aptámero (o covalente) pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido, permitiendo la separación de la proteína (o péptido) y el complejo de afinidad por aptámero (o covalente) de aptámero libre. Tal marcado puede incluir, por ejemplo, un resto de biotina que puede incorporarse en la proteína o péptido.

En una realización, una marca de Captura 2 se une a la proteína (o péptido) tanto antes el ensayo, durante la preparación del ensayo, como durante el ensayo uniendo químicamente la marca a las dianas. En una realización, la marca de Captura 2 es una marca separable. En una realización, la marca separable comprende un conector escindible y una marca. Generalmente no es necesario, sin embargo, liberar la proteína (o péptido) del soporte sólido de Captura 2. Como se ha descrito anteriormente, las dianas marcadas pueden ser capturadas sobre un segundo soporte sólido donde el soporte sólido comprende un elemento de captura apropiado para la marca diana. El soporte sólido puede entonces lavarse para eliminar el aptámero libre de la solución.

En una realización, la marca diana introducida para Captura 2 es la misma marca que aquella en el aptámero usado para Captura 1. En esta realización, el marcado de la diana se realiza después de la etapa de Captura 1 y antes de la introducción de soporte sólido de Captura 2. En una realización, los sitios no ocupados con aptámeros sobre el soporte de Captura 1 pueden bloquearse antes de marcar las dianas si el marcado de las dianas se hace mientras que esté en el soporte de Captura 1.

En otra realización, el complejo de afinidad por aptámero o el complejo covalente de aptámero pueden capturarse sobre el segundo soporte sólido directamente mediante la asociación a un reactivo de captura sobre el segundo soporte sólido. En esta realización no es necesario el marcado de dianas explícito. En una realización, el segundo soporte sólido contiene un anticuerpo que se une a la molécula diana. En otra realización, el soporte contiene un fragmento Fc que se une a la molécula diana. En otra realización, cuando la molécula diana es IgG, IgM, IgA o IgE, el soporte puede contener proteína A para unirse a la proteína diana. Cualquier reactivo de captura que se una a la molécula diana en un complejo de afinidad por aptámero o covalente de aptámero puede usarse para la etapa de Captura 2.

En otra realización, la eliminación del aptámero libre puede llevarse a cabo usando técnicas físicas en vez de una marca diana explícita y un segundo soporte sólido. En una realización donde la molécula diana es una proteína o péptido, esto se lleva a cabo precipitando los complejos covalentes de aptámero y dejando el aptámero libre en el sobrenadante que va a desecharse [obsérvese que esto funciona solo para complejos covalentes]. Tal precipitación de proteína o péptido puede llevarse a cabo con SDS y sal alta, normalmente K^+ , por ejemplo. Después de la precipitación con SDS- K^+ , el complejo covalente de aptámero puede recuperarse para la cuantificación.

Después de eliminar el aptámero libre lavando el segundo soporte sólido, los complejos de afinidad por aptámero se someten entonces a una etapa de disociación en la que los complejos se alteran para dar el aptámero libre mientras que las moléculas diana generalmente siguen unidas al soporte sólido mediante la interacción de unión de la sonda y marca de captura diana. El aptámero del complejo de afinidad por aptámero puede ser liberado por cualquier método que altere la estructura de tanto el aptámero como la diana. Esto puede lograrse mediante lavado de los complejos de afinidad por aptámero unidos al soporte en tampón de sal alta que disocia los complejos aptámero-diana no covalentemente unidos. Se recogen y detectan aptámeros libres eluidos. En otra realización, se usa pH alto o bajo para alterar los complejos de afinidad por aptámero. En otra realización se usa temperatura alta para disociar los complejos de afinidad por aptámero. En otra realización, puede usarse una combinación de cualquiera de los métodos anteriores.

En el caso de complejos covalentes de aptámero, la liberación del aptámero para la posterior cuantificación se lleva a cabo usando un conector escindible en la construcción de aptámero. En otra realización, un conector escindible en la marca diana producirá la liberación del complejo covalente de aptámero.

Exposición cinética usando un competidor

Como se usa en el presente documento, "molécula competidora" y "competidor" se usan indistintamente para referirse a cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con una molécula no diana, por ejemplo, para prevenir que la molécula no diana se vuelva a unir no específicamente a un aptámero. Una "molécula competidora" o "competidor" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula. "Moléculas competidoras" o "competidores" se refiere a más de un conjunto de dichas moléculas. Las moléculas competidoras incluyen oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN monocatenario de esperma de salmón y polidextranos (por ejemplo, sulfato de dextrano)), polímeros de fosfodiéster abásico, dNTPs y pirofosfato. En el caso de una exposición cinética que usa un competidor, el competidor también puede ser cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con un aptámero libre, por ejemplo, para prevenir que el aptámero se vuelva a unir no específicamente a una molécula no diana. Tales moléculas competidoras incluyen policationes (por ejemplo, espermina, espermidina, polilisina y poliarginina) y aminoácidos (por ejemplo, arginina y lisina). Cuando se usa un

competidor como exposición cinética se utiliza una concentración bastante alta con respecto a la concentración esperada de proteína total o aptámero total presente en la muestra. En una realización, como competidor en una exposición cinética se usa sulfato de dextrano 10 mM.

5 **Exposición cinética usando dilución**

En algunas realizaciones, la exposición cinética se realiza diluyendo la muestra de ensayo con tampón de unión o cualquier otra solución que no aumente significativamente la tasa de disociación natural de complejos de afinidad por aptámero. La dilución puede ser aproximadamente 2X, aproximadamente 3X, aproximadamente 4X, aproximadamente 5X, o cualquier dilución mayor adecuada. Diluciones más grandes proporcionan una exposición cinética más eficaz, reduciendo la concentración de proteína total y aptámero después de la dilución y, por tanto, la tasa de su re-asociación. Si se usa dilución para introducir una exposición cinética, la posterior mezcla de muestra de ensayo que contiene el complejo de afinidad por aptámero puede concentrarse antes del procesamiento adicional. Si es aplicable, esta concentración puede llevarse a cabo usando métodos descritos en el presente documento con respecto a la separación opcional de cualquier aptámero libre de la muestra de ensayo y/o la eliminación opcional de otros componentes de la muestra de ensayo que pueden reaccionar con el agente de marcado. Cuando se usa dilución como exposición cinética, la cantidad de dilución se selecciona para ser hasta práctica, en vista de tanto el volumen de muestra de ensayo inicial como el deseo de recuperar el complejo de afinidad por aptámero del volumen (diluido) final sin incurrir en una pérdida significativa de complejo.

20 **Exposición cinética usando dilución y un competidor**

En algunas realizaciones, la exposición cinética se realiza de tal manera que el efecto de dilución de muestra y el efecto de introducir un competidor se realicen simultáneamente. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede diluirse con un gran volumen de competidor. Combinar estas dos estrategias de exposición cinética puede proporcionar una exposición cinética más eficaz que puede lograrse usando una estrategia. En una realización, la dilución puede ser aproximadamente 2X, aproximadamente 3X, aproximadamente 4X, aproximadamente 5X, o cualquier dilución mayor adecuada y el competidor es sulfato de dextrano 10 mM.

30 **VIII. Elementos de captura, marcas y sondas**

En diversas realizaciones, los complejos de afinidad por aptámero (o covalentes) se capturan o inmovilizan sobre el soporte sólido usando una marca incorporada en el aptámero (marca de aptámero), o unida a la diana. Por ejemplo, si la marca en el aptámero es biotina, pueden usarse perlas que tienen un elemento de captura tal como avidina, estreptavidina, neutravidina, extravidina, y similares, sobre la superficie para capturar los complejos de afinidad por aptámero (o covalentes). Las perlas se lavan para eliminar cualquier diana libre (sin complejo).

Composiciones de marca

Como se ha desvelado en el presente documento, un aptámero puede comprender además una "marca", que se refiere a un componente que proporciona un medio para unir o inmovilizar un aptámero (y cualquier molécula diana que esté unida a él) a un soporte sólido. Una "marca" es un conjunto de copias de un tipo o especie de componente que es capaz de asociarse a un "elemento de captura". "Marcas" o "elementos de captura" se refiere a más de un conjunto tal de componentes. La marca puede unirse a o incluirse en el aptámero por cualquier método adecuado. Generalmente, la marca permite que el aptámero se disocie, tanto directa como indirectamente, con un elemento de captura o receptor que está unido al soporte sólido. El elemento de captura normalmente se elige (o diseña) para ser altamente específico en su interacción con la marca y para retener esa asociación durante las posteriores etapas de procesamiento o procedimientos. Una marca puede permitir la localización de un complejo de afinidad por aptámero (o complejo de afinidad por aptámero covalente) en una dirección espacialmente definida sobre un soporte sólido. Por tanto, diferentes marcas pueden permitir la localización de diferentes complejos covalentes de aptámero en diferentes direcciones espacialmente definidas sobre un soporte sólido. Una marca puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un affibody, un mimético de anticuerpo, un receptor de célula, un ligando, un lípido, biotina, polihistidina, o cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otra estructura con la que un elemento de captura (o molécula de conector, como se describe más adelante) pueda diseñarse o configurarse para unirse o asociarse de otro modo con especificidad. Generalmente, una marca está configurada de forma que no interaccione intramolecularmente con tanto ella misma como el aptámero con el que se une o del que es una parte. Si se usa SELEX para identificar un aptámero, la marca puede añadirse al aptámero tanto pre- como post-SELEX. En una realización, la marca se incluye en el extremo 5' del aptámero post-SELEX. En otra realización, la marca se incluye en el extremo 3' del aptámero post-SELEX. En otra realización más, las marcas pueden incluirse en tanto los extremos 3' como 5' de los aptámeros en un proceso de modificación post-SELEX. En otra realización, la marca puede estar interna en el aptámero.

En una realización, la marca es el grupo biotina y el elemento de captura es una proteína de unión a biotina tal como avidina, estreptavidina, neutravidina, extravidina. Esta combinación puede usarse convenientemente en diversas realizaciones, ya que la biotina se incorpora fácilmente en aptámeros durante la síntesis y las perlas de

estreptavidina están fácilmente disponibles.

En una realización, la marca es polihistidina y el elemento de captura es ácido nitrilotriacético (NTA) quelado con un ión metálico tal como níquel, cobalto, hierro, o cualquier otro ión metálico capaz de formar un compuesto de coordinación con poli-histidina cuando se quela con NTA.

En una realización, la marca es un polinucleótido que se diseña para hibridarse directamente con un elemento de captura que contiene una secuencia de polinucleótidos complementaria. En este caso, la marca se denomina algunas veces una "marca de secuencia" y el elemento de captura se denomina generalmente una "sonda". En esta realización, la marca está generalmente configurada y la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones tales que la marca no se hibride con una sonda distinta de la sonda para la que la marca es un complemento perfecto. Esto permite el diseño de un formato de ensayo múltiple, ya que combinación de marca/sonda puede tener secuencias únicas.

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

En otra realización, una marca puede asociarse directamente a una sonda y unirse covalentemente a la sonda, uniendo así covalentemente el aptámero a la superficie del soporte sólido. En esta realización, la marca y la sonda pueden incluir grupos reactivos adecuados que, tras la asociación de la marca a la sonda, se aproximan lo suficientemente entre sí para someterse a una reacción química que produce un enlace covalente. La reacción puede producirse espontáneamente o puede requerir activación, tal como, por ejemplo, foto-activación o activación química. En una realización, la marca incluye un resto de dieno y la sonda incluye un dienófilo, y la formación del enlace covalente resulta de una reacción de conjugación de Diels-Alder espontánea del dieno y el dienófilo. Puede usarse cualquier química complementaria apropiada, tal como, por ejemplo, reacción de N-Mannich, formación de disulfuros, reacción de Curtius, condensación de Aldol, formación de base de Schiff y adición de Michael.

En otra realización, la marca se asocia indirectamente a una sonda, tal como, por ejemplo, mediante una molécula de conector, como se describe adicionalmente más adelante. En esta realización, la marca puede incluir una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una región o componente particular de una molécula de conector. La marca está generalmente configurada y la reacción de hibridación se lleva a cabo de forma que la marca no se hibride con una secuencia de polinucleótidos distinta de la secuencia de polinucleótidos incluida en la molécula de conector.

Si la marca incluye un polinucleótido, el polinucleótido puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. En una realización, una marca incluye al menos aproximadamente 10 nucleótidos. En otra realización, la marca incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 nucleótidos. En otra realización más, la marca incluye al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Diferentes marcas que incluyen un polinucleótido pueden incluir tanto el mismo número de nucleótidos como un número diferente de nucleótidos.

En algunas realizaciones, el componente de marca es bi-funcional porque incluye funcionalidad para la interacción específica con un elemento de captura sobre un soporte sólido o "sonda" como se define más adelante (componente de asociación de sonda), y funcionalidad para disociar la molécula con la que está unida el componente de asociación de sonda de la marca. Los medios para disociar el componente de asociación de sonda de la marca incluyen medios químicos, medios fotoquímicos, u otros medios que dependen de la marca particular que se emplea.

En algunas realizaciones, la marca se une al aptámero. En otras realizaciones, la marca se une a la molécula diana. La marca puede unirse a la molécula diana antes de la etapa de unión del aptámero, o puede unirse a la molécula diana o complejo de afinidad por aptámero (o foto) después de alcanzarse el equilibrado de unión (o fotorreticulación).

Composiciones de elemento de captura

Como se usa en el presente documento, "elemento de captura", "sonda" o "receptor" se refiere a una molécula que está configurada para asociarse, tanto directa como indirectamente, a una marca. Un "elemento de captura", "sonda" o "receptor" es un conjunto de copias de un tipo de molécula o un tipo de estructura multi-molecular que es capaz de

inmovilizar el resto al que la marca se une a un soporte sólido asociándose, tanto directa como indirectamente, a la marca. "Elementos de captura", "sondas" o "receptores" se refieren a más de un conjunto tal de moléculas. Un elemento de captura, sonda o receptor puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un affibody, un mimético de anticuerpo, un receptor de célula, un ligando, un lípido, biotina, polihistidina, o cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otra estructura con la que una marca (o molécula de conector) pueda diseñarse o configurarse para unirse o asociarse de otro modo con especificidad. Un elemento de captura, sonda o receptor puede unirse a un soporte sólido tanto covalentemente como no covalentemente por cualquier método adecuado.

Mientras que los términos "elemento de captura", "sonda" y "receptor" se usan indistintamente, sonda generalmente se refiere a una secuencia de polinucleótidos. En una realización, la sonda incluye un polinucleótido que tiene una secuencia que es complementaria a una secuencia de marca de polinucleótido. En esta realización, la secuencia de sonda está generalmente configurada y la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones tales que la sonda no se hibride con una secuencia de nucleótidos distinta de la marca para que la sonda incluye la secuencia complementaria (es decir, la sonda está generalmente configurada y la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones tales que la sonda no se hibride con una marca o un aptámero diferente).

En otra realización, la sonda se asocia indirectamente a una marca, por ejemplo, mediante una molécula de conector. En esta realización, la sonda puede incluir una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a una región o componente particular de una molécula de conector. La sonda está generalmente configurada y la reacción de hibridación se lleva a cabo de forma que la sonda no se hibride con una secuencia de polinucleótidos distinta de la secuencia de polinucleótidos incluida en la molécula de conector.

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 tanto el mismo número de nucleótidos como un número diferente de nucleótidos.

En algunas realizaciones, la sonda de captura es bi-funcional porque incluye funcionalidad para la interacción específica con una marca de polinucleótido, y funcionalidad para disociar la sonda del soporte sólido de forma que la sonda y el aptámero se liberen simultáneamente. Los medios para disociar la sonda del soporte sólido incluyen medios químicos, medios fotoquímicos o cualquier medio que depende de la sonda de captura particular que se emplea.

Debido a la naturaleza recíproca de la interacción entre un par marca particular y elemento de captura, una marca en una realización puede usarse como elemento de captura en otra realización, y un elemento de captura en una realización puede usarse como marca en otra realización. Por ejemplo, un aptámero con una marca de biotina puede ser capturado con estreptavidina unida a un soporte sólido en una realización, mientras que un aptámero con una marca de estreptavidina puede ser capturado con biotina unida a un soporte sólido en otra realización.

Marcado de diana

En algunas realizaciones, se desea inmovilizar complejos de afinidad por aptámero (o covalentes) a un soporte sólido para permitir el aislamiento de complejos de afinidad por aptámero (o covalentes) y eliminar el aptámero libre. En una realización, la marca se añade a la molécula diana del complejo de afinidad (o covalente) usando un reactivo que es altamente reactivo con la molécula diana y débilmente reactivo (o idealmente no reactivo) con el aptámero. En esta realización, la marca se diseña de forma que el marcado de diana de complejos de afinidad por aptámero se lleve a cabo con poca o ninguna disociación del complejo de afinidad, por ejemplo, a un pH y fuerza iónica que es compatible con la interacción de afinidad y no cambia la conformación de la diana o el aptámero, y un grado de marcado que no introduce una gran pluralidad de marcas en cada molécula diana de forma que se afecte la interacción con el aptámero. El marcado de diana de complejos covalentes de aptámero no comparte estas restricciones y puede llevarse a cabo bajo cualquier condición adecuada para el marcado eficaz.

En algunas realizaciones, puede ser importante asegurar que el reactivo de marcado marque la mayoría, si no todas, de las proteínas presentes en una muestra de ensayo, pero no tienda a marcar, o marque solo mínimamente, ácidos nucleicos u otros componentes del ensayo, tales como el soporte sólido. Cualquier grupo químico reactivo encontrado en las proteínas, pero no encontrado en ácidos nucleicos o la superficie del sustrato, puede servir de sitio de unión covalente. Grupos químicos reactivos a modo de ejemplo incluyen aminas primarias (por ejemplo, en restos de lisina), tioles (por ejemplo, en cisteína, que puede producirse por la reducción de enlaces disulfuro), alcoholes (por ejemplo, en serina, treonina, tirosina, y restos de azúcar en glucoproteínas (incluyendo los productos de oxidación de cis-dioles en tales azúcares)) y carboxilatos (por ejemplo, en ácido glutámico y aspártico). En una realización, el reactivo de marcado comprende una marca activada con N-hidroxisuccinimida, que reacciona preferencialmente con restos de lisina en proteínas y péptidos.

Las condiciones óptimas para marcar diferentes complejos de afinidad por aptámero (o foto) pueden ser diferentes, y normalmente se determinan empíricamente para optimizar la sensibilidad del método. En una realización, la concentración del agente de marcado es normalmente suficiente para detectar al menos aproximadamente el 1 % de las moléculas diana. En otra realización, la concentración del agente de marcado es normalmente suficiente para detectar al menos aproximadamente el 10 % de las moléculas diana. En otra realización, la concentración del agente de marcado es normalmente suficiente para detectar al menos aproximadamente el 90 % de las moléculas diana.

En una realización, la diana es una proteína o péptido y la marca es una biotina unida a la diana usando un reactivo estándar para la biotilación de proteínas, tal como, por ejemplo, NHS-PEO4-biotina. Otros reactivos adecuados incluyen sulfo-NHS-LC-biotina, PFP-biotina, TFP-PEO3-biotina, o cualquier otro reactivo adecuado que pueda usarse para unir una marca a una proteína.

IX. Conectores y conectores escindibles

Como se usa en el presente documento, un conector es una estructura molecular que se usa para conectar dos grupos funcionales o estructuras moleculares. Como se usa en el presente documento, "conector espaciador", o más simplemente un "espaciador", se refiere a un grupo de átomos benignos que proporciona separación o espacio entre dos grupos funcionales diferentes dentro de un aptámero. Como se usa en el presente documento, un elemento, resto o conector "separable" o "escindible" se refiere a una estructura molecular que puede romperse para producir dos componentes separados. Un elemento separable (o escindible) puede comprender una única molécula en la que un enlace químico puede romperse (denominado en el presente documento un "conector escindible integrado"), o puede comprender dos o más moléculas en las que una interacción no covalente puede romperse o alterarse (denominado en el presente documento un "conector de hibridación").

Conector espaciador

En algunas realizaciones, es necesario separar espacialmente ciertos grupos funcionales de otros con el fin de prevenir la interferencia con las funcionalidades individuales. Por ejemplo, la presencia de una etiqueta, que absorbe ciertas longitudes de onda de luz, próximas a un grupo fotoescindible puede interferir con la eficiencia de la fotoescisión. Por tanto, es deseable separar tales grupos con un resto de no interferencia que proporcione separación espacial suficiente para recuperar, por ejemplo, la actividad completa de fotoescisión. En algunas realizaciones, un "conector espaciador" se ha introducido en un aptámero con tanto una etiqueta como funcionalidad de fotoescisión.

En una realización, se introducen espaciadores conectores en el aptámero durante la síntesis y así puede estar comprendido de un número de espaciadores de fosforamidito, que incluyen, pero limitados a, cadenas de carbono alifáticas de longitud 3, 6, 9, 12 y 18 átomos de carbono, cadenas de polietilenglicol de longitud 1, 3 y 9 unidades de etilenglicol, o un resto de tetrahidrofurano (llamado dSpacer (Glenn Research) o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otra estructura o componente químico que pueda diseñarse o configurarse para añadir longitud a lo largo de un esqueleto de fosfodiéster. En otra realización, el conector espaciador incluye polinucleótidos, tales como poli dT, dA, dG, o dC o poli U, A, G, o C o cualquier combinación de los anteriores. En otra realización, los espaciadores incluyen uno o más restos de ribosa o desoxirribosa abásicos. Obsérvese que tales secuencias se diseñan de forma que no interfieran con la estructura o función del aptámero.

Conector escindible integrado

Como se usa en el presente documento, un "conector escindible integrado" se refiere a un grupo de átomos que contiene un elemento separable o escindible. En algunas realizaciones, un conector escindible integrado se usa para unir un aptámero a una marca, formando así una marca separable. Por ejemplo, puede utilizarse un conector separable integrado en cualquiera de los ensayos descritos para crear una conexión separable entre un aptámero y una biotina (por ejemplo, en los ensayos de afinidad y ensayos de reticulación) o una conexión separable entre un aptámero y un grupo de fotoreticulación (por ejemplo, en los ensayos de reticulación).

En una realización, el conector escindible integrado puede ser foto-escindible porque incluye un enlace que puede escindirse irradiando el elemento separable a la longitud de onda apropiada de luz. En otra realización, el conector escindible integrado puede ser químicamente escindible porque incluye un enlace que puede escindirse tratándolo con un reactivo químico o enzimático apropiado. En otra realización, el elemento separable incluye un enlace disulfuro que puede escindirse tratándolo con un agente reductor para alterar el enlace.

Conector de hibridación

Como se usa en el presente documento, un "conector de hibridación" se refiere a un conector que comprende dos o más moléculas en las que una interacción no covalente puede romperse o alterarse mediante métodos químicos o físicos. En algunas realizaciones, un conector de hibridación se usa para unir un aptámero a una marca, formando así una marca separable. Por ejemplo, puede utilizarse un conector de hibridación en cualquiera de los ensayos descritos para crear una conexión separable entre un aptámero y una biotina (por ejemplo, en los ensayos de

afinidad y ensayos de reticulación) o una conexión separable entre un aptámero y un grupo de fotorreticulación (por ejemplo, en los ensayos de reticulación).

En una realización, un conector de hibridación comprende dos ácidos nucleicos que se hibridan para formar un enlace no covalente. En una realización, uno de los ácidos nucleicos que forma el enlace de hibridación puede ser una región del propio aptámero y el otro ácido nucleico puede ser un ácido nucleico que es complementario a esa región. La liberación puede llevarse a cabo por cualquier mecanismo adecuado para alterar los dúplex de ácido nucleico (mientras que todavía mantengan la compatibilidad con el ensayo). En una realización, se usa NaOH 20 mM para alterar el conector de hibridación en el ensayo de fotorreticulación de captura doble. Un molécula de conector de hibridación puede tener cualquier configuración adecuada y puede incluir cualquier componente adecuado, que incluye uno o más polinucleótidos, polipéptidos, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, oligosacáridos, polisacáridos, anticuerpos, affibodies, miméticos o fragmentos de anticuerpo, receptores, ligandos, lípidos, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otra estructura o componente químico que pueda diseñarse o configurarse para formar una estructura separable.

En una realización, la marca separable consiste en al menos un polinucleótido que consiste en un número adecuado de nucleótidos. En una realización, un componente de polinucleótido de una molécula de conector incluye al menos aproximadamente 10 nucleótidos. En otra realización, un componente de polinucleótido de una molécula de conector incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 nucleótidos. En otra realización más, un componente de polinucleótido de una molécula de conector incluye al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Las moléculas de conector usadas en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento pueden incluir componentes de polinucleótido que tienen tanto el mismo número de nucleótidos como un número diferente de nucleótidos.

X. Soportes sólidos para su uso en Captura 1 y Captura 2

"Soporte sólido" se refiere a cualquier sustrato que tiene una superficie al que las moléculas pueden unirse, directa o indirectamente, mediante tanto enlaces covalentes como no covalentes. El soporte sólido puede incluir cualquier material de sustrato que sea capaz de proporcionar soporte físico para los elementos de captura o sondas que se unen a la superficie. El material es generalmente capaz de aguantar condiciones relacionadas con la unión de los elementos de captura o sondas a la superficie y cualquier tratamiento, manipulación o procesamiento posterior encontrado durante la realización de un ensayo. Los materiales pueden existir de forma natural, ser sintéticos, o una modificación de un material que existe de forma natural. Materiales de soporte sólido adecuados pueden incluir silicio, grafito, superficies de espejo, laminados, cerámicas, plásticos (incluyendo polímeros tales como, por ejemplo, poli(cloruro de vinilo), copolímeros de ciclo-olefinas, geles de agarosa, poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon®), nailon, poli(butirato de vinilo)), germanio, arseniuro de galio, oro, plata, etc., tanto usados ellos mismos como conjuntamente con otros materiales. Pueden considerarse materiales rígidos adicionales, tales como vidrio, que incluye sílice y adicionalmente incluye, por ejemplo, vidrio que está disponible como Bioglass. Otros materiales que pueden emplearse incluyen materiales porosos, tales como, por ejemplo, perlas de vidrio de poro controlado, Sepharose en perlas reticulada o resinas de agarosa, o copolímeros de bisacrilamida reticulada y azalactona. También se contempla cualquier otro material conocido en la técnica que sea capaz de tener uno o más grupos funcionales, tal como cualquiera de un grupo funcional amino, carboxilo, tiol, o hidroxilo, por ejemplo, incorporado sobre su superficie.

El material usado para un soporte sólido puede tomar cualquiera de varias configuraciones que varían de simples a complejas. El soporte sólido puede tener una cualquiera de varias formas, que incluyen una tira, placa, disco, varilla, partícula, que incluye perla, tubo, pocillo y similares. El soporte sólido puede ser poroso o no poroso, magnético, paramagnético, o no magnético, polidisperso o monodisperso, hidrófilo o hidrófobo. El soporte sólido también puede estar en forma de un gel o suspensión de partículas estrechamente empaquetadas (como en una matriz de columna) u holgadamente empaquetadas.

En una realización, el soporte sólido con elemento de captura unido se usa para capturar complejos de afinidad por aptámero o complejos covalentes de aptámero marcados de una mezcla de ensayo. En un ejemplo particular, cuando la marca es un resto de biotina, el soporte sólido podría ser una perla recubierta de estreptavidina o resina tal como DynaBeads M-280 Streptavidin, DynaBeads MyOne Streptavidin, DynaBeads M-270 Streptavidin (Invitrogen), Streptavidin Agarose Resin (Pierce), Streptavidin Ultralink Resin, perlas MagnaBind Streptavidin (Thermo Scientific), BioMag Streptavidin, ProMag Streptavidin, Silica Streptavidin (Bangs Laboratories), Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare), Streptavidin Polystyrene Microspheres (Microspheres-Nanospheres), Streptavidin Coated Polystyrene Particles (Spherotech), o cualquier otra perla recubierta de estreptavidina o resina comúnmente usada por un experto en la materia para capturar moléculas marcadas con biotina.

XI. Métodos de detección

Como se ha descrito anteriormente, es un objetivo de la presente divulgación convertir una señal de proteína en una señal de aptámero. Como resultado, la cantidad de aptámeros recogidos/detectados es indicativo de, y puede ser

directamente proporcional a, la cantidad de moléculas diana unidas y a la cantidad de moléculas diana en la muestra. Pueden emplearse varios esquemas de detección sin eluir el complejo de afinidad por aptámero o covalente de aptámero del segundo soporte sólido después de la separación de Captura 2. Además de las siguientes realizaciones de métodos de detección, otros métodos de detección serán conocidos para un experto en la materia/

Detección: Etiquetas y marcado de aptámero

Muchos métodos de detección requieren que una etiqueta explícita se incorpore en el aptámero antes de la detección. Algunas etiquetas, tales como colorantes fluorescentes o quimioluminiscentes, pueden incorporarse en aptámeros tanto durante como después de la síntesis usando técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos. Pueden incorporarse etiquetas radiactivas tanto durante la síntesis como después de la síntesis usando reacciones enzimáticas estándar con los reactivos apropiados. También puede producirse marcado después de la separación de Captura 2 y la elución usando diversas técnicas enzimáticas para un experto en la materia. Por ejemplo, usando un cebador con las etiquetas anteriormente mencionadas, la PCR incorporará etiquetas en el producto de amplificación de los aptámeros eluidos. Si se usa una técnica en gel para la cuantificación, pueden incorporarse diferentes etiquetas de masa de tamaño usando PCR también. Estas etiquetas de masa también pueden incorporar diferentes colorantes fluorescentes o quimioluminiscentes para la capacidad múltiple adicional. Las etiquetas pueden añadirse indirectamente a los aptámeros usando una marca específica incorporada en el aptámero, tanto durante la síntesis como después de la síntesis, y entonces añadir una sonda que se asocia a la marca y lleva la etiqueta. Las etiquetas incluyen aquellas descritas anteriormente, además de enzimas usadas en ensayos estándar para, por ejemplo, lecturas colorimétricas.

Detección: Detección de un único aptámero

Por ejemplo, el aptámero puede marcarse, como se ha descrito anteriormente, con un isótopo radiactivo tal como ^{32}P antes de ponerse en contacto con la muestra de ensayo. Empleando uno cualquiera de los cuatro ensayos básicos, y variaciones de los mismos como se trata anteriormente, la detección del aptámero puede realizarse simplemente cuantificando la radioactividad sobre el segundo soporte sólido al final del ensayo. Los recuentos de radioactividad serán directamente proporcionales a la cantidad de diana en las muestras de ensayo originales. Similarmente, el marcado de un aptámero con un colorante fluorescente, como se ha descrito anteriormente, antes de poner en contacto con la muestra de ensayo permite una lectura fluorescente simple directamente sobre el segundo soporte sólido. Puede emplearse una etiqueta quimioluminiscente o un punto cuántico similarmente para la lectura directa del segundo soporte sólido, no requiriendo elución del aptámero.

Eluyendo el aptámero o liberando el complejo covalente de fotoaptámero del segundo soporte sólido adicional pueden emplearse esquemas de detección, además de aquellos descritos anteriormente. Por ejemplo, el aptámero liberado, fotoaptámero o complejo covalente de fotoaptámero pueden ejecutarse sobre un gel PAGE y detectarse y opcionalmente cuantificarse con una tinción de ácidos nucleicos, tal como SYBR Gold. Alternativamente, el aptámero liberado, fotoaptámero o complejo covalente de fotoaptámero pueden detectarse y cuantificarse usando electroforesis en gel capilar (CGE) usando una etiqueta fluorescente incorporada en el aptámero como se ha descrito anteriormente. Otro esquema de detección emplea PCR cuantitativa para detectar y cuantificar el aptámero eluido, por ejemplo, usando SYBR Green. Alternativamente, puede emplearse el ensayo de ADN Invader® para detectar y cuantificar el aptámero eluido.

En otra realización, la cantidad o concentración del complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se determina usando una "sonda fluorescible molecular" durante un 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 sonda fluorescible molecular es una sonda de ácido nucleico específica que se pliega en un bucle en horquilla y contiene un flúor sobre un extremo y un extintor sobre el otro extremo de la estructura de horquilla de forma que se genera poca o ninguna señal por el flúor cuando se forma la horquilla. La secuencia del bucle es específica para una secuencia de polinucleótidos diana y, tras la hibridación con la secuencia del aptámero, la horquilla se despliega y así genera una señal fluorescente.

Detección: Detección de múltiples aptámeros para pequeños números de analitos.

Para la detección múltiple de un pequeño número de aptámeros todavía unidos al segundo soporte sólido, pueden emplearse colorantes fluorescentes con diferentes espectros de excitación / emisión para detectar y cuantificar dos, o tres, o cinco, o hasta diez aptámeros individuales. Similarmente, pueden emplearse puntos cuánticos de tamaño diferente para las lecturas múltiples. Los puntos cuánticos pueden introducirse después de la separación del aptámero libre del segundo soporte sólido. Usando secuencias de hibridación específicas de aptámero unidas a puntos cuánticos únicos pueden realizarse lecturas múltiples para 2, 3, 5 y hasta 10 aptámeros. También puede usarse marcado de diferentes aptámeros con diferentes isótopos radiactivos que pueden ser individualmente detectados, tales como ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{13}C y ^{35}S , para lecturas múltiples limitadas.

Detección: Detección de múltiples aptámeros a gran escala

Para la detección múltiple de aptámeros liberados del segundo soporte sólido de Captura 2, puede usarse un único colorante fluorescente, incorporado en cada aptámero como se ha descrito anteriormente, con un método de cuantificación que permite la identificación de la secuencia del aptámero junto con la cuantificación del nivel de aptámero. Los métodos incluyen, pero no se limitan a, hibridación en chip de ADN, hibridación en micro-perla y análisis CGE.

Detección: Chips de hibridación de ADN

En una realización, se usa una matriz de hibridación de ADN estándar, o chip, para hibridar cada aptámero o fotoaptámero con una sonda única o serie de sondas únicas inmovilizadas sobre un portaobjetos o chip tal como matrices Agilent, matrices Illumina BeadChip o matrices NimbleGen. Cada sonda única es complementaria a una secuencia en el aptámero. La secuencia complementaria puede ser una marca de hibridación única incorporada en el aptámero, o una porción de la secuencia del aptámero, o la secuencia del aptámero entera. Los aptámeros liberados del soporte sólido de Captura 2 se añaden a un tampón de hibridación apropiado y se procesan usando métodos de hibridación estándar. Por ejemplo, la solución de aptámero se incuba durante 12 horas con una matriz de hibridación de ADN a aproximadamente 60 °C para garantizar la rigurosidad de la hibridación. Las matrices se lavan y entonces se barren en un escáner de portaobjetos fluorescente, produciendo una imagen de la intensidad de hibridación del aptámero en cada característica de la matriz. Se lleva a cabo segmentación y cuantificación de imágenes usando software de procesamiento de imágenes, tal como ArrayVision. En una realización, pueden detectarse ensayos de aptámero múltiple usando hasta 25 aptámeros, hasta 50 aptámeros, hasta 100 aptámeros, hasta 200 aptámeros, hasta 500 aptámeros, hasta 1000 aptámeros y hasta 10.000 aptámeros.

Detección: Hibridación tipo Luminex

En una realización, se usan micro-perlas direccionables que tienen sondas de ADN únicas complementarias a los aptámeros como se ha descrito anteriormente para la hibridación. Las micro-perlas pueden ser direccionables con colorantes fluorescentes únicos, tales como tecnología de perlas Luminex, o usar etiquetas de códigos de barras como en la tecnología Illumina VeraCode, o transpondedores láser. En una realización, los aptámeros liberados del soporte sólido de Captura 2 se añaden a un tampón de hibridación apropiado y se procesan usando métodos de hibridación de micro-perlas estándar. Por ejemplo, la solución de aptámero se incuba durante dos horas con un conjunto de micro-perlas a aproximadamente 60 °C para garantizar la rigurosidad de la hibridación. Las soluciones se procesan entonces en un instrumento Luminex que cuenta los tipos de perlas individuales y cuantifica la señal fluorescente del aptámero. En otra realización, perlas VeraCode se ponen en contacto con la solución de aptámero y se hibridan durante dos horas a aproximadamente 60 °C y luego se depositan sobre una superficie de rejilla y se barren usando un escáner de portaobjetos para la identificación y cuantificación de fluorescencia. En otra realización, las micro-perlas del transpondedor se incuban con la muestra de aptámero a aproximadamente 60 °C y entonces se cuantifican usando un dispositivo apropiado para las micro-perlas del transpondedor. En una realización, pueden detectarse ensayos de aptámero múltiple por hibridación con micro-perlas usando hasta 25 aptámeros, hasta 50 aptámeros, hasta 100 aptámeros, hasta 200 aptámeros y hasta 500 aptámeros.

Detección: Electroforesis en gel capilar (CGE)

La muestra que contiene los aptámeros eluidos puede procesarse para incorporar etiquetas de masa únicas junto con etiquetas fluorescentes como se ha descrito anteriormente. Los aptámeros marcados con masa se inyectan entonces en un instrumento de CGE, esencialmente un secuenciador de ADN, y los aptámeros se identifican por sus masas únicas y se cuantifican usando fluorescencia del colorante incorporada durante la reacción de marcado. Un ejemplo a modo de ejemplo de esta técnica ha sido desarrollado por Althea Technologies.

Detección: Amplificación antes de la detección

En muchos de los métodos descritos anteriormente, la solución de aptámeros puede amplificarse y opcionalmente marcarse antes de la cuantificación. Puede usarse amplificación por PCR estándar con la solución de aptámeros eluidos del soporte sólido de Captura 2. Tal amplificación puede usarse antes de la hibridación en matrices de ADN, hibridación en micro-perlas y lectura de CGE.

Detección: Otros métodos basados en PCR

En otra realización, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) 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 tal forma y bajo condiciones controladas tales que los resultados del ensayo sean cuantitativos, es decir, el ensayo sea capaz de cuantificar la cantidad o concentración de aptámero presente en la muestra de ensayo.

En una realización, la cantidad o concentración del complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) en la muestra de ensayo se determina usando PCR TaqMan®. Esta técnica generalmente se basa en la actividad de 5'-3' exonucleasa de la enzima de replicación de oligonucleótidos para generar una señal de una secuencia diana. Se selecciona una sonda TaqMan basándose en la secuencia del aptámero que va a cuantificarse y generalmente incluye un flúor del extremo 5', tal como 6-carboxifluoresceína, por ejemplo, y un extintor del extremo 3', tal como, por ejemplo, una 6-carboxitetrametilfluoresceína, para generar señal a medida que la secuencia del aptámero se amplifica usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A medida que la polimerasa copia la secuencia del aptámero, la actividad de exonucleasa libera el flúor de la sonda, que se hibrida en la dirección 3' de los cebadores de PCR, generando así la señal. La señal aumenta a medida que se produce el producto de replicación. La cantidad de producto de PCR depende de tanto el número de ciclos de replicación realizados, además de la concentración de partida del aptámero.

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

Detección: Espectroscopía de masas

En otra realización, el complejo de afinidad por aptámero (o complejo covalente de aptámero) se detecta y/o cuantifica usando espectrometría de masas. Pueden introducirse marcas de masa única usando las técnicas enzimáticas descritas anteriormente. Para la lectura de espectroscopía de masas, no se requiere etiqueta de detección, más bien se usa la propia masa para tanto identificar como, usando técnicas comúnmente usadas por aquellos expertos en la materia, cuantificar basándose en la localización y área bajo los picos de masa generados durante los análisis de espectroscopía de masas. Un ejemplo usando espectroscopía de masas es el sistema MassARRAY® desarrollado por Sequenom.

XII. Composición de aptámeros

Se proporcionan construcciones de aptámero que incluyen diferentes funcionalidades incorporadas. Estas funcionalidades pueden incluir marcas para la inmovilización, etiquetas para la detección, grupos fotorreactivos, medios para promover o controlar la separación, etc. En una realización, un aptámero incluye una sección escindible o separable (también descrita como un elemento o componente) en la secuencia del aptámero. Estos componentes o elementos adicionales son elementos o componentes estructurales que introducen funcionalidad adicional en el aptámero y así son elementos o componentes funcionales. En otras realizaciones, el aptámero incluye uno o más de los siguientes componentes adicionales (también descritos en el elemento o componente o resto funcional o estructural): un componente marcado o detectable, un componente espaciador, un elemento escindible, y una marca de unión específica o el elemento o componente de inmovilización. Por ejemplo, en una realización del aptámero de fotorreticulación, el aptámero incluye una marca conectada al aptámero mediante un resto escindible, una etiqueta, un componente espaciador que separa la etiqueta y el resto escindible, y un resto de fotorreticulación, como se muestra en la FIG. 3L.

Todas las construcciones de aptámero pueden sintetizarse usando química de fosforamidito estándar. Construcciones de aptámero representativas se muestran en las FIG. 3A a FIG. 3L. La funcionalidad puede fraccionarse entre el extremo 5' y 3' o combinarse en cualquier extremo. Además de restos fotoescindibles, pueden usarse otros restos escindibles, que incluyen restos químicamente o enzimáticamente escindibles. Puede usarse varios restos de espaciador y pueden incluirse uno o más restos de biotina. También pueden incorporarse marcas (también denominados los elementos o componentes de inmovilización o de unión específica) distintas de biotina. Reactivos de construcción adecuados incluyen biotina fosforamidito, PC Linker (Glen Research PN 10-4920-02); PC biotin phosphoramidite (Glen Research PN 10-4950-02); dSpacer CE phosphoramidite (Glen Research PN 10-1914-02); Cy3 Phosphoramidite (Glen Research PN 10-5913-02); y Arm26-Ach Spacer Amidite (Fidelity Systems PN SP26Ach-05). Como se ilustra en la FIG. 3K, un colorante fluorescente (tal como Cy3), un espaciador, los restos fotoescindibles y de biotina pueden añadirse al extremo del aptámero. En una realización, debido a las posibles interacciones entre el resto fotoescindible y el colorante, el espaciador se inserta entre estos dos restos.

En una realización, la marca se une covalentemente al aptámero, como se ilustra en las FIGS. 3I-3K. En otra realización, la marca se une indirectamente al aptámero en forma de una secuencia de polinucleótidos hibridada, que es complementaria a una porción de la secuencia del aptámero, que tiene una marca covalentemente unida, como se ilustra en las FIGS. 3E-3H.

En una realización, un aptámero puede modificarse adicionalmente para incluir un primer resto escindible situado entre el grupo de reticulación y una secuencia única dentro del aptámero. Este primer resto escindible puede, por ejemplo, ser escindible mediante varios medios diferentes que incluyen químicos, fotoquímicos o iónicos

dependiendo del resto escindible empleado. En una realización, un aptámero tiene la estructura mostrada en la FIG. 3B. Por ejemplo, el grupo de fotorreticulación puede ser 4-azido-2-nitro-anilina y el grupo fotoescindible, o resto separable, puede ser un conector PC disponible de Glen Research como fosforamidito (- (4,4'-dimetoxitritil)-1-(2-nitrofenil)-propan-1-il-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito).

En otras realizaciones, el aptámero incluye una marca de captura que está unida al aptámero mediante un grupo separable. Por ejemplo, una marca de captura de biotina puede unirse al aptámero mediante un segundo oligonucleótido que se hibrida con el aptámero como se ilustra en la FIG. 3F. En otras realizaciones, otras marcas de captura o elementos escindibles pueden unirse al mismo aptámero. Por ejemplo, una marca de poli-His puede unirse al aptámero mediante un segundo resto químico o fotoescindible. La ventaja de esta construcción de aptámero es que pueden aplicarse dos etapas de procesamiento diferentes para separar el complejo de afinidad por aptámero (o covalente) de otros componentes en la muestra de ensayo. Estas etapas de separación pueden usarse en cualquier secuencia deseada.

En otra realización, también puede incluirse una etiqueta de detección dentro del aptámero como se ilustra en la FIG. 3C. Esta etiqueta de detección proporciona la detección y/o cuantificación del aptámero libre en la etapa final del ensayo como se describe en detalle anteriormente. Por ejemplo, para la detección fluorescente, un colorante fluorescente tal como el colorante Cy3 o Cy5 puede incorporarse dentro del aptámero. Puede introducirse Cy3 usando el fosforamidito Cy3 de Glen Research (cloruro de [3-(4-monometoxitritiloxi) propil]-1'-[3-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)fosforamiditil]propil]-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina)), pero puede incluirse cualquier etiqueta adecuada en el aptámero.

XIII. Definiciones generales

Como se usa en esta memoria descriptiva, que incluye las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contenido dicte claramente de otro modo, y se usan indistintamente con "al menos uno" y "uno o más." Así, referencia a "un aptámero" incluye mezclas de aptámeros, referencia a "una sonda" incluye mezclas de sondas, y similares.

Como se usa en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene", y cualquier variación de los mismos, pretende cubrir una inclusión no exclusiva, de forma que un proceso, método, producto por proceso, o composición de materia que comprende, incluye o contiene un elemento o lista de elementos, no incluya solo aquellos elementos, sino que puede incluir otros elementos no expresamente enumerados o inherentes a tal proceso, método, producto por proceso o composición de materia.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" representa una modificación o variación insignificativa de los valores numéricos tal que la función básica del artículo a la que se refiere el valor numérico sea igual.

Como se usa en el presente documento, "asociar", "se asocia", y cualquier variación de los mismos, se refiere a una interacción o complejación entre una marca y una sonda que produce un complejo suficientemente estable para permitir la separación de materiales "no asociados" o no unidos, tales como, por ejemplo, componentes no unidos de una muestra de ensayo, del complejo marca-sonda bajo condiciones de complejación o de reacción dadas. Una marca y una sonda pueden asociarse entre sí directamente por interacción y uniéndose entre sí con especificidad.

Una marca y una sonda también pueden asociarse entre sí indirectamente tal como cuando su complejación está mediada por una molécula de conector.

Puede utilizarse 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 él que, cuando se carga en un ordenador, realiza o ayuda 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, concretamente, un resultado de ensayo, que puede evaluarse en el lugar donde se realiza el ensayo o puede transportarse a otro lugar para la evaluación y comunicación a una parte interesada en una localización remota, si se desea. Como se usa en el presente documento, "localización remota" se refiere a una localización que es físicamente diferente de aquella en la que se obtienen los resultados. Por consiguiente, los resultados pueden ser enviados a una sala diferente, un edificio diferente, una parte diferente de la ciudad, una ciudad diferente, etc. Los datos pueden transmitirse por cualquier medio adecuado tal como, por ejemplo, fax, correo, entrega nocturna, correo electrónico, ftp, mensaje de voz, y similares.

"Comunicar" información se refiere a la transmisión de los datos que representan esa información como señales eléctricas mediante un canal de comunicación adecuado (por ejemplo, una red privada o pública). "Remitir" un artículo se refiere a cualquier medio para conseguir ese artículo de una localización a la siguiente, tanto transportando físicamente ese artículo como de otro modo (donde eso sea posible) e incluye, al menos en el caso de

datos, transportar físicamente un medio que lleva los datos o que comunica los datos.

Ejemplos

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

10 Lo anterior describe la divulgación con referencia a diversas realizaciones y ejemplos. Ninguna realización particular, ejemplo, o elemento de una realización o ejemplo particular, debe interpretarse como un elemento o característica crítico, requerido o esencial de cualquiera de las reivindicaciones.

15 Se apreciará que pueden hacerse diversas modificaciones y sustituciones a las realizaciones desveladas. La memoria descriptiva, que incluye las figuras y ejemplos, va a considerarse de una forma ilustrativa, en vez de una restrictiva, y todas tales modificaciones y sustituciones pretenden estar incluidas dentro del alcance de la divulgación. El alcance de la invención puede determinarse por las reivindicaciones adjuntas, en vez de por los ejemplos.

Ejemplo 1. Construcciones de aptámero y de cebador

20 Se produjeron construcciones de aptámero y de cebador biotinilado con diferentes grupos funcionales del extremo 5' y las diferencias se muestran en la FIG. 6. El aptámero contuvo un colorante fluorescente Cy3 (Cy3 Phosphoramidite de Glen Research (cloruro de [3-(4-monometoxitritiloxi)propil]-1'-[3-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)fosforamiditil]propil]-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina)) en el extremo 5', y el cebador contuvo dos restos de biotina ((AB)₂), un conector (T)₈ y un resto fotoescindible (PC Linker disponible de Glen Research como fosforamidito -(4,4'-

25 dimetoxitritil)-1-(2-nitrofenil)-propan-1-il-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito). Para el método descrito en la FIG. 6, el aptámero contuvo un grupo de reticulación fotorreactivo denominado en el presente documento ANA (4-azido-2-nitro-anilina), un resto fotoescindible (PC Linker) y un colorante Cy3 en el extremo 5', y el cebador contuvo dos restos de biotina y un conector (T)₈.

Ejemplo 2. Método de unión por afinidad (método de Captura 2)

a) Tampón

35 Se combinaron 30 µl de una mezcla Cy3-aptámero (2 nM cada aptámero) con 30 µl de una mezcla (AB)₂-T8-PC-cebador (6 nM para cada cebador) en SB 17T y se incubó a 95 °C durante 4 minutos, a 37 °C durante 13 minutos. En una reacción separada, se prepararon 60 µl de una mezcla de proteína diana (2X concentración en SB 17T). Se combinaron 55 µl de la mezcla de proteína diana con 55 µl de la mezcla aptámero/cebador en una placa de 96 pocillos (Omni-Tube Plate, Abgene #AB0407) y se incubó a 37 °C durante 15 minutos para lograr el equilibrio de unión. Todas las siguientes etapas se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

b) Plasma, suero o sangre completa

45 Se combinaron 30 µl de una mezcla Cy3-aptámero (2 nM cada aptámero) con 30 µl de una mezcla (AB)₂-T8-PC-cebador (6 nM para cada cebador) en SB 17T y se incubó a 95 °C durante 4 minutos, a 37 °C durante 13 minutos. En una reacción separada, se prepararon 30 µl de una dilución 1x a 2,5x de una mezcla compleja de proteínas biológicas (plasma, suero, sangre completa) en un diluyente que contenía el oligonucleótido competidor Z-Block (5'-(ACZZ)₇AC-3', donde Z = 5-bencil-dUTP, 4 µM) y se incubó durante 5 minutos. La mezcla compleja de proteínas biológicas se combinó con 30 µl de una mezcla de proteína diana (concentración 4X en SB 17T). Se combinaron 55 µl de la mezcla proteína diana/matriz biológica con 55 µl de la mezcla aptámero/cebador y se incubó a 37 °C durante

50 15 minutos para lograr el equilibrio de unión. Todas las siguientes etapas se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

c) Captura de aptámero biotinilado y eliminación de proteína libre

55 Se lavaron 133 µl de resina de estreptavidina-agarosa (estreptavidina inmovilizada de Pierce, #20353, suspensión acuosa al 7,5 %) dos veces con 200 µl de SB 17T por filtración a vacío a través de una membrana Durapore (MultiScreen-HV45, Millipore #MAHVN4550). Se añadieron 100 µl de la mezcla aptámero:proteína a la resina lavada y se incubó durante 15 minutos. La resina se lavó una vez con 200 µl de SB 17T que contenía biotina 10 µM (Sigma-Aldrich, Inc. #B4501-1G) y una vez con 200 µl de SB 17T por filtración a vacío.

d) Marcado de proteína y liberación de aptámero

65 Se añadieron 100 µl de SB 17T que contenía NHS-PEO4-biotina 1,2 mM (Pierce #21329) a la resina lavada y se mezcló durante 20 minutos. La resina se lavó cinco veces con 200 µl de SB 17T por filtración a vacío y una vez con 200 µl de SB 17T por centrifugación, se resuspendió en 75 µl de SB 17T que contenía sulfato de dextrano 10 mM (Mr ~5000, Sigma-Aldrich #31404), y se irradió con una lámpara de UV (dos bombillas de luz negra Silvania 350,

15W, muestra 5 cm de la fuente) 5 minutos con mezcla. La resina se eliminó por centrifugación a través de la membrana Durapore, y el eluato con los complejos aptámero:proteína liberados se recogió en una placa de 96 pocillos de 1,1 ml (placa de pocillos profundos de 1,1 ml, Marsh Biomedical #DW9611) que contenía 150 µl de SB 17T + sulfato de dextrano 10 mM.

5 e) Captura de proteína y eliminación de aptámero libre

Se añadieron 50 µl de resina de estreptavidina (DynaBeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen #650-03, 10 mg/ml en SB 17T) a una membrana Durapore. Se añadieron 225 µl de la mezcla aptámero:proteína a la resina y se mezclaron durante 15 minutos. La resina se lavó dos veces con 200 µl de SB 17T que contenía sulfato de dextrano 10 mM, una vez con 200 µl de SB 17T por filtración a vacío, y una vez con 200 µl de SB 17T por centrifugación.

10 f) Liberación del aptámero complejo

15 La resina se resuspendió en 90 µl de tampón de elución (NaOH 2 mM, 0,1 % de Tween-20) y se mezcló durante 5 minutos. Durante este tiempo, el aptámero se liberó del complejo proteína:aptámero. La resina se eliminó por centrifugación, y se recogió el eluato con el aptámero liberado. Se neutralizaron 80 µl del eluato y se tamponaron con 20 µl de tampón de neutralización (HCl 8 mM, Tris-HCl 0,5 mM (pH 7,5), 0,1 % de Tween-20). El aptámero se detectó como se describe en el Ejemplo 4.

20 g) Resultados

Se creó una serie de dilución de doce puntos en tampón para once analitos de proteína (bFGF, eotaxina-2, FGF7, FGF-16, GDNF, IL-7, IL-20, linfotactina, TARC, tPA, VEGF) a partir de una concentración 10 nM o 3 nM (bFGF, FGF7, tPA, linfotactina) de cada analito y diluyendo en serie hasta 33 fM con diluciones semilogarítmicas (factor de dilución de 3,1623). Se incluyeron dos controles no de proteína dando un total de catorce muestras. La mezcla Cy3-aptámero contuvo los once aptámeros con las proteínas diana en la serie de dilución, además de veintiocho aptámeros de control cuyas proteínas diana estuvieron ausentes. Se prepararon tres series de dilución por duplicado. Los resultados se exponen en las FIGS. 7- 10.

30 Las Figuras 7A a C muestran representaciones de unidades relativas de fluorescencia (URF) frente a la concentración (log-log curva de respuesta a dosis) para tres de las once proteínas diana en tampón. Se calcularon los valores del límite de detección (LOD) para cada proteína como la concentración de proteína que da una señal igual al promedio más dos desviaciones estándar de los valores no de proteína). Los LODs para las tres proteínas fueron 630 fM (bFGF), 90 fM (FGF7) y 530 fM (linfotactina). El ensayo de afinidad es capaz de detectar proteínas en tampón a niveles sub-picomolares.

35 La Figura 8 muestra una representación de unidades de fluorescencia relativas (URF) frente a la concentración para las tres mediciones por duplicado para la proteína diana linfotactina en tampón. Las tres líneas representan curvas de respuesta a dosis para cada uno de los tres duplicados. Las curvas por duplicado concuerdan muy bien entre sí, indicando un alto nivel de reproducibilidad para el protocolo del ensayo de afinidad.

40 También se realizó una serie de dilución de doce puntos en 10 % de plasma para cinco analitos de proteína (bFGF, eotaxina-2, linfotactina, tPA y VEGF) a partir de una concentración 10 nM (VEGF y eotaxina-2) o 3 nM (bFGF, tPA, linfotactina) de cada analito y diluyendo en serie hasta 420 fM o 126 fM con diluciones de 2,5 veces. Se incluyeron dos controles no de proteína dando un total de catorce muestras que posteriormente se hibridaron en un portaobjetos de micromatriz. La mezcla Cy3-aptámero contuvo los cinco aptámeros con respecto a las proteínas diana en la serie de dilución, además de cinco aptámeros de control cuyas proteínas diana estuvieron ausentes. El ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente con las siguientes excepciones. Se diluyó 100 % de PPT-plasma (plasma humano reunido) 1 a 2 con Z-block 5 µM en 0,5x SB18, 0,05 % de Tween-20. Se mezclaron 40 µl de esta solución al 50 % de plasma con 60 µl de una mezcla de proteína a 3,33x concentración final. Se combinaron 50 µl de la mezcla plasma/proteína con 50 µl de mezcla aptámero/cebador (aptámero 3 nM, cebador 9 nM). La reacción de unión de equilibrio se realizó a 37 °C durante 15 min. Se añadieron 40 µl de la mezcla sangre completa-proteína-aptámero (en lugar de 100 µl) a la resina de estreptavidina-agarosa y se mezclaron durante 15 min.

50 La Figura 9 muestra una representación de unidades de fluorescencia relativas (URF) frente a la concentración para la proteína diana linfotactina en 10 % de plasma humano. Esta curva es similar en forma y respuesta a las curvas de respuesta a dosis en tampón. Esto muestra que el protocolo de ensayo de afinidad puede realizarse, pero no se limita a la solución al 10 % de plasma.

60 La Figura 10 muestra una representación de unidades de fluorescencia relativas (URF) frente a la concentración para la proteína diana linfotactina en 10 % de sangre humana completa. Esta curva es similar en forma y respuesta a las curvas de respuesta a dosis en 10 % de plasma humano (Figura 9), y demuestra el rendimiento del protocolo del ensayo de afinidad en matrices biológicas complejas sin ningún efecto de matriz evidente.

Ejemplo 3. Protocolo de ensayo de fotorreticulación

Todas las etapas de este protocolo se realizaron con exposición mínima a la luz para prevenir la fotoactivación del fotoaptámero.

a) Unión de proteína

Se combinaron 30 µl de una mezcla ANA-PC-Cy3-aptámero (2 nM cada aptámero) con 30 µl de una mezcla (AB)2-T8-cebador (6 nM para cada aptámero) en tampón SB 17T (HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, 0,05 % de Tween-20) y se incubaron a 95 °C durante 4 minutos, a 37 °C durante 13 minutos. En una reacción separada, se prepararon 60 µl de una mezcla de proteína a una concentración 2X. Se combinaron 55 µl de la mezcla de proteína diana con 55 µl de la mezcla aptámero/cebador en una placa de 96 pocillos (Omni-Tube Plate, Abgene #AB0407) y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos para lograr el equilibrio de unión. Todas las siguientes etapas se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

b) Exposición cinética y fotorreticulación

Se añadieron 100 µl de muestra equilibrada a 1400 µl de SB 17T que contenía sulfato de dextrano 10 mM (Mr ~5000, Sigma-Aldrich #31404) y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. La muestra de 1,5 ml se irradió con 470 nm de luz (matriz de LED a medida) a 37 °C durante 10 minutos para reticular covalentemente las proteínas unidas a los fotoaptámeros.

c) Captura de aptámero biotinilado y eliminación de proteína libre

Se añadieron 40 µl de resina de estreptavidina (DynaBeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen #650-03, 10 mg/ml en SB 17T) a la muestra de 1,5 ml y se incubaron a 25 °C durante 30 minutos con mezcla. La resina se sedimentó por centrifugación y se eliminaron 1,4 ml de sobrenadante. La resina y el sobrenadante restante se transfirieron a una membrana Durapore (MultiScreen-HV45, Millipore #MAHVN4550) y el sobrenadante se eliminó por filtración a vacío. La resina se lavó dos veces con 200 µl de SB 17T que contenía biotina 10 µM (Sigma-Aldrich, Inc. #B4501-1 g) y una vez con 200 µl de SB 17T por filtración a vacío.

d) Marcado de proteína y liberación de aptámero (libre y complejo)

Se añadieron 100 µl de SB 17T que contenía NHS-PEO4-biotina 1,2 mM (Pierce #21329) a la resina lavada y se mezcló durante 20 minutos. La resina se lavó tres veces con tampón de lavado de guanidina 200 µl (guanidina 3 M, NaCl 50 mM, HEPES 40 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, 0,05 % de Tween-20, TROLOX 1 mM), y dos veces con 200 µl de tampón de lavado HEPES (NaCl 50 mM, HEPES 40 mM pH 7,5, 0,05 % de Tween-20, TROLOX 1 mM) por filtración a vacío. La resina se resuspendió en 110 µl de NaOH 20 mM y se mezcló durante 5 minutos. La resina se eliminó por centrifugación, y se recogió el eluato de NaOH con complejos aptámero:proteína liberados. Se neutralizaron 100 µl de eluato con 25 µl de HCl 80 mM, y se tamponaron con 10 µl de HEPES 55 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 2 M y 1 % de Tween-20.

e) Captura de proteína y eliminación de aptámero libre

Se lavaron 133 µl de resina de estreptavidina (estreptavidina inmovilizada de Pierce, #20347, 10 % de suspensión acuosa) dos veces con 200 µl de SB 17T por filtración a vacío a través de una membrana de PVDF Durapore. Se añadieron 135 µl de mezcla aptámero:proteína a la resina lavada y se mezclaron durante 20 minutos. La resina se lavó una vez con 200 µl de tampón de lavado de guanidina a 50 °C durante 10 minutos con mezcla, una vez con 200 µl de NaOH 20 mM durante 2 minutos con mezcla, dos veces con 200 µl de SB 17T por filtración a vacío, y una vez con 200 µl de SB 17T por centrifugación.

f) Liberación del aptámero fotorreticulado

La resina se resuspendió en 100 µl de SB 17T y se irradió con una lámpara de UV (dos bombillas de luz negra Silvania 350, 15W, muestra 5 cm de la fuente) durante 20 minutos con mezcla. Durante este tiempo, el aptámero fotorreticulado con la proteína se libera por fotoescisión. La resina se eliminó por centrifugación a través de la membrana Durapore, y se recogió el eluato con aptámero liberado.

Ejemplo 4. Protocolo de detección por micromatriz**a) Preparación de muestras**

Se añadieron 30 µl de 4X tampón de hibridación (NaCl 3,638 M, fosfato de Na 200 mM, pH 7,5, oligonucleótido marcado de esquinas 1 nM, TROLOX 4 mM, 0,1 % de Tween-20) a 90 µl de muestra de ensayo (producto de la etapa e del Ejemplo 2 o etapa f del Ejemplo 3).

b) Portaobjetos de micromatriz

Se ensambló un módulo ProPlate Slide (junta de CSW, adhesivo de FLC; Grace BioLabs, #204841) con un portaobjetos de micromatriz que contenía 14 (7x2) matrices separadas 9 mm. Cada matriz consistió en tres réplicas de 96 oligonucleótidos modificados con amina complementarios a la región al azar de los aptámeros. Los oligonucleótidos se imprimieron con una impresora de contacto internamente sobre portaobjeto de polímero de 3' x 1' patentados.

c) Bloqueo de micromatrices

Se añadieron 100 µl de tampón de bloqueo (caseína bloqueante en PBS, Pierce #37528, TROLOX 1 mM) a los pocillos del módulo ProPlate Slide y se incubaron a 65 °C durante 15-30 minutos. Se eliminó el tampón de bloqueo.

d) Hibridación y lavado

Se añadieron 110 µl de muestra de ensayo a la micromatriz, y se dispuso un bloque de aluminio de 3 x 1 x 0,125 pulgadas encima del módulo ProPlate Slide. El conjunto se envolvió en lámina de aluminio y se incubó a 65 °C durante 16 horas sin mezcla en una cámara de humedad. Se sacaron la lámina de Al y el bloque de Al junto con la muestra de ensayo, y la micromatriz se aclaró una vez con 200 µl de tampón de lavado 1 (fosfato de Na 50 mM, pH 7,5, 0,1 % de Tween-20), precalentado a 65 °C. Se eliminó el tampón de lavado 1 y se desmontó el módulo ProPlate Slide. El portaobjetos de micromatriz se dispuso en un frasco de papanicolau que contenía 25 ml de tampón de lavado 1 (precalentado a 65 °C) y se incubó a 65 °C durante 15 minutos con mezcla. El portaobjetos de micromatriz se transfirió a un segundo frasco de papanicolau que contenía 25 ml de tampón de lavado 2 (fosfato de Na 50 mM, pH 7,5, precalentado a 65 °C) y se incubó a 65 °C durante 5 minutos con mezcla. El portaobjetos de micromatriz se transfirió a un tercer frasco de papanicolau que contenía 25 ml de tampón de lavado 2 y se incubó a 65 °C durante 5 minutos con mezcla. El portaobjetos de micromatriz se sacó del tampón de lavado 2 y se secó inmediatamente en una corriente de nitrógeno seco.

e) Detección

El portaobjetos de micromatriz se barrió con un escáner láser de fluorescencia TECAN LS300 Reloaded, y la señal de fluorescencia se cuantificó en cada característica usando el paquete de software ArrayVision (8.0 Rev 3.0, Imaging Research, Inc.). La señal de fluorescencia se cuantificó usando la densidad como medida principal, con segmentación y forma de puntos variable. El archivo de exportación xml se importó de una base de datos para el análisis de datos adicional.

f) Protocolo de detección por PCR cuantitativa**Diseño de cebadores**

Se eligieron cebadores de amplificación para cada aptámero usando PrimerQuest (Integrated DNA Technologies) con configuraciones de parámetros por defecto, excepto Tm mín del cebador = 60 °C, óptimo = 65 °C, y máx = 70 °C, e intervalo del tamaño de productos = 50-100 pb. Los cebadores candidatos fueron aquellos analizados para complementariedad del extremo 3' de horquilla interna, homo-dímero y hetero-dímero, con OligoAnalyser 3.0 (Integrated DNA Technologies) con configuraciones de parámetros por defecto, excepto conc. de oligo = 0,2 µM. Los candidatos se rechazaron si ΔG de la complementariedad del extremo 3' $\leq -3,5$ kcal/mol.

Reacción de PCR cuantitativa

Se diluyeron 5 µl de muestra de ensayo neutralizada (véase la etapa 5 del protocolo del ensayo de afinidad (Ejemplo 2) o la etapa 6 del protocolo del ensayo de fotorreticulación (Ejemplo 3)) 20X con 95 µl de dH₂O. Se prepararon 20 µl de reacciones de amplificación con 5 µl de muestra de ensayo diluida y 1X tampón KOD (Novagen #), 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1X SYBR Green I (Invitrogen #), 0,2 µM de cada uno del cebador de 5' y 3', y 0,025 U/µl de ADN Polimerasa KOD XL (Novagen #). Las muestras se prepararon en una campana biológica con reactivos libres de contaminantes. Se usaron un par de cebadores en cada reacción para la cuantificación de un aptámero. También se prepararon muestras con cantidades conocidas de aptámero para generar curvas patrón. Las muestras se amplificaron en un Bio-Rad iCycler incubando a 95 °C durante 2 minutos, ciclando 40 veces a 95 °C durante 15 segundos, seguido de 72 °C durante 60 segundos.

Análisis de datos

Para cada aptámero, se determinaron valores del ciclo umbral (Ct) para cada muestra de las representaciones de amplificación, y se usaron para generar una curva patrón para cada aptámero con el software de análisis de datos suministrado con Bio-Rad iCycler. El número de copias de cada aptámero en cada muestra de ensayo se determinó usando la curva patrón, y se convirtió en la concentración de aptámero después de ajustar para el factor de dilución y el volumen de muestra. La concentración de aptámero en cada muestra de ensayo se representó en función de la

concentración de proteína de entrada.

Ejemplo 5. Detección de proteína en tampón usando el protocolo de ensayo de fotorreticulación y detección de matrices

Se creó una serie de dilución de diez puntos en tampón para trece analitos de proteína (angiogenina, BLC, C3a, factor de coagulación V, factor de coagulación XI, CTACK, endostatina, FGF7, IGFBP-3, precalicreína, PSA-ACT, TIMP-1 y tPA) a partir de una concentración 10 nM de cada analito y diluyendo en serie hasta 330 fM con diluciones semilogarítmicas (factor de dilución de 3,1623). Se incluyeron cuatro controles no de proteína dando un total de catorce muestras. La mezcla Cy3-aptámero contuvo los trece aptámeros con las proteínas diana en las series de dilución, junto con catorce aptámeros de control cuyas proteínas diana estuvieron ausentes. Las muestras se procesaron usando el protocolo del ensayo de fotorreticulación (Ejemplo 3) y se cuantificaron con detección por micromatriz como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se exponen en la FIG. 11, que muestra una representación de unidades relativas de fluorescencia (URF) frente a la concentración para la proteína diana angiogenina en tampón.

Ejemplo 6. Detección de proteína en tampón usando el protocolo de ensayo de afinidad y Q-PCR

Se creó una serie de dilución de diez puntos en tampón para doce analitos de proteína (angiogenina, C1q, complejo C5b.6, CMP-SAS, EG-VEGF, IP-10, PAI-1, PDGF-BB, protrombina, E-selectina, tPA y vWF) a partir de una concentración 10 nM de cada analito y diluyendo en serie hasta 330 fM con diluciones semilogarítmicas (factor de dilución de 3,1623). Se incluyeron cuatro controles no de proteína dando un total de catorce muestras. La mezcla Cy3-aptámero contuvo los doce aptámeros con las proteínas diana en las series de dilución. Las muestras se procesaron usando el protocolo de ensayo de afinidad (Ejemplo 2) y se cuantificaron por Q-PCR (Ejemplo 4). Se usaron los cebadores 2175-47-F3 (5'-GAGTGTGTGACGAGTGTGGAG-3') (SEQ ID NO:_) y 2175-47-R3 (5'-TCGGTTGTGGTGACGCCCG-3') (SEQ ID NO:_) para la cuantificación del aptámero de angiogenina 2175-47 en las muestras de ensayo. Los resultados se exponen en la FIG. 12, que muestra una representación logarítmica de la concentración de aptámero detectada frente a la concentración de proteína de entrada para angiogenina.

Ejemplo 7: Se permiten mediciones de proteína en muestras de ensayo por aptámeros con constantes de disociación lentas.

Preparación de mezclas aptámero/cebador y muestras de ensayo

Se mezclaron aptámeros con una etiqueta de detección Cy3-biotina (4 nM cada una) con 3X exceso de sonda de captura (oligonucleótido complementario a la región fija de 3' del aptámero que contenía una marca de biotina y elemento fotoescindible) en 1X SB 17T y se calentaron a 95 °C durante 4 minutos, luego 37 °C durante 13 minutos, y se diluyeron 1:4 en 1x SB 17T. Se añadieron 55 µl de mezcla aptámero/cebador a una placa de microtitulación (Hybaid # AB-0407) y se selló con lámina. Las muestras de ensayo se preparan en una placa de microtitulación mezclando concentraciones conocidas de analitos de proteína en SB 17T y diluyendo en serie con SB 17T.

Equilibrado de muestras

Se añaden 55 µl de mezcla aptámero/cebador a 55 µl de muestra de ensayo y se incuban a 37 °C durante 15 minutos en una placa de microtitulación sellada con lámina. La concentración final de cada aptámero en la mezcla de equilibrado es 0,5 nM. Después del equilibrado, todas las etapas posteriores de este método se realizan a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

Captura de aptámero y eliminación de proteína libre

Se lava una vez una placa de filtración DuraPore (Millipore HV cat# MAHVN4550) con 100 µl de 1X SB 17T por filtración a vacío, se añaden 133,3 µl de 7,5 % de resina de estreptavidina-agarosa (Pierce) a cada pocillo y se lava dos veces con 200 µl de 1X SB 17T. Se transfieren 100 µl de muestras equilibradas a la placa Durapore que contenía la resina de estreptavidina-agarosa y se incuban en una termomezcladora (Eppendorf) a 800 rpm durante 5 minutos. La resina se lava una vez con 200 µl de 1X SB 17T + biotina 100 µM y una vez con 200 µl de 1X SB 17T.

Marcado de proteínas con biotina

Se añaden 100 µl de NHS-PEO4-biotina 1,2 mM en SB 17T, preparado inmediatamente antes de uso, a la resina con aptámero capturado y complejos aptámero:proteína y se incuban en una termomezcladora a 800 rpm durante 20 minutos. La resina se lava cinco veces con 200 µl de 1X SB 17T por filtración a vacío.

Proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta y fotoescisión

Se elimina el conductor de goteo de la parte inferior de la placa DuraPore y la placa se coloca sobre una placa de recogida de microtítulo de 1 ml. La resina se lava una vez con 200 µl de 1X SB 17T por centrifugación a 1000 x g

durante 30 s. Se añaden 80 ul de 1X SB 17T + DxSO₄ 10 mM a la resina y se irradia con una lámpara de mercurio BlackRay en una termomezcladora a 800 rpm durante 10 minutos. La placa DuraPore se transfiere a una nueva placa de pocillos profundos de 1 ml y se centrifuga a 1000 x g durante 30 segundos para recoger el aptámero fotoescidido y los complejos de proteína:aptámero.

Captura de proteína y eliminación de aptámero libre

Se añaden 50 ul de perlas paramagnéticas MyOne-streptavidin C1 (Invitrogen) (10 mg/ml en 1X SB 17T) a una placa de microtitulación. Las perlas se separan con un imán durante 60 segundos y el sobrenadante se elimina. Se añaden 225 ul de mezcla de fotoescisión a las perlas y se mezcla durante 5 minutos. Las perlas se lavan cuatro veces con 200 ul de 1X SB 17T separando las perlas magnéticas y sustituyendo el tampón de lavado. Se elimina el tampón de lavado final.

Elución de aptámero

Se añaden 100 ul de tampón de elución fosfato de sodio (Na₂HPO₄ 10 mM, pH 11) a las perlas y se mezclan durante 5 minutos. Se transfieren 90 ul de eluato a una placa de microtitulación y se neutralizan con 10 ul de tampón de neutralización de fosfato de sodio (NaH₂PO₄ 10 mM, pH 5).

Hibridación de aptámero a micromatrices

Se preparan matrices de ADN con sondas de captura de oligonucleótido que comprenden la secuencia complementaria de la región variable de cada aptámero inmovilizado sobre un soporte de portaobjetos de microscopio a medida. Existen múltiples matrices (submatrices) sobre cada portaobjetos, y las submatrices se separan físicamente fijando una junta (Grace) para la aplicación de muestras. Las matrices se pretratan con 100 ul de tampón de bloqueo y se incubaron durante 15 minutos a 65 °C en una termomezcladora. Se añaden 30 ul de tampón de hibridación a 90 ul de eluato de aptámero neutralizado en una placa de microtitulación, se incuban a 95 °C durante 5 minutos en un ciclador térmico y se enfrían a 65 °C a 0,1 °C/segundo. Se elimina el tampón de bloqueo de las matrices y se añaden 110 ul de muestra de aptámero a las matrices y se incuban en una cámara húmeda a 65 °C durante 20 horas.

Lavado de matrices

Se elimina la muestra de aptámero de las matrices y las matrices se lavan una vez con 200 ul de fosfato de sodio, tampón de lavado Tween-20 a 65 °C, con la junta en su sitio, y tres veces con 25 ml de fosfato de sodio, tampón de lavado Tween-20 a 65 °C en un frasco de papanicolau con la junta quitada. Las matrices se secan con una pistola de nitrógeno.

Cuantificación de señales sobre matrices

Se barren portaobjeto de matriz en un TECAN LS300 Reloaded en un canal apropiado para la detección de Cy3 y se cuantifica la señal de Cy3 en cada característica de matriz.

Resultados:

Se produjeron aptámeros específicos para tres dianas diferentes (bFGF, VEGF y mieloperoxidasa) usando métodos y materiales de SELEX tradicionales. Se preparó un segundo conjunto de aptámeros específicos para el mismo conjunto de dianas usando nucleótidos modificados en la posición 5 y se seleccionaron para constantes de disociación muy lentas para sus dianas respectivas. Los aptámeros preparados en el proceso tradicional tuvieron constantes de disociación medidas en el orden de menos de 5 minutos. Los aptámeros preparados con los nucleótidos modificados y usando el proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta durante la selección tuvieron constantes de disociación de más de 20 minutos. Se prepararon dos conjuntos de aptámeros para cada diana por los dos métodos diferentes durante un total de 4 poblaciones de aptámeros diferentes para cada diana. La capacidad de estas poblaciones de aptámeros para medir las concentraciones de analito en muestras de ensayo se evaluó como se ha descrito anteriormente durante un intervalo de concentraciones de diana. Se representó la detección de señal relativa del chip de ADN contra la concentración de diana de entrada. Véanse las FIG. 13A a 13C. La curva de respuesta de los aptámeros tradicionales es muy plana y la sensibilidad de la detección es bastante baja. La sensibilidad de detección de las dianas respectivas con los aptámeros de constante de disociación lenta es excelente. Los datos soportan la necesidad de usar los aptámeros de disociación lenta para el máximo rendimiento analítico.

Ejemplo 8. Reproducibilidad usando aptámeros de constante de disociación lenta

Usando el método del Ejemplo 7, se fraccionó una muestra de plasma en 68 alícuotas diferentes. El ensayo del Ejemplo 7 se realizó en cada una de las 68 muestras. 34 de las muestras se combinaron y se fraccionaron otra vez. Las 34 muestras restantes se volvieron a probar simplemente. De este modo, la reproducibilidad del ensayo puede

probarse para la consistencia dentro de y entre ensayos. La disposición de muestras y el esquema de detección se muestran en la Figura 14. La Figura 15 muestra el % de CV en la medición de todas las muestras indicadas en la Figura 14. Las muestras reunidas y sin reunir tienen el mismo CV.

5 Ejemplo 9: Método de unión de afinidad de captura única

a) Equilibrado de aptámeros con plasma, suero o sangre completa

10 Se combinan 30 ul de una mezcla Cy3-aptámero (20 nM cada aptámero) con 30 ul de una mezcla (AB)2-T8-PC-
cebadador (60 nM para cada cebador) en SB 17T y se incuba a 95 °C durante 4 minutos y a 37 °C durante 13 minutos.
Se combinan 55 ul de la mezcla compleja de proteínas biológica (plasma, suero o sangre completa), diluida 1:1000
en SB 17T, con 55 ul de la mezcla aptámero/cebadador y se incuba a 37 °C durante 15 minutos para lograr el equilibrio
de unión. Todas las siguientes etapas se realizan a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

15 **b) Marcado de proteínas**

Se combinan 100 ul de mezcla aptámero:proteína con 10 ul de SB 17T que contenía NHS-PEO4-biotina 500 uM
(Pierce #21329) y se incuba durante 20 minutos a 37 °C. El exceso de reactivo de NHS se inactiva añadiendo 10 ul
de tampón Tris 200 mM (pH 7,5) a la mezcla de reacción e incubando durante 10 minutos a 37 °C.

20 **c) Captura de proteínas y eliminación de aptámero libre**

Se añaden 100 ul de resina de estreptavidina (DynaBeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen #650-03, 10 mg/ml en
SB 17T) a una membrana Durapore para capturar complejos aptámero/proteína. Se añaden 100 ul de la mezcla
25 aptámero:proteína a la resina, se mezcla durante 15 minutos, y se filtra a vacío para eliminar el aptámero libre. La
resina se lava tres veces con 200 ul de SB 17T por filtración a vacío, y una vez con 200 ul de SB 17T por
centrifugación.

30 **d) Liberación del aptámero complejo**

La resina se resuspende en 90 ul de tampón de elución (NaOH 2 mM, 0,1 % de Tween-20) y se mezcla durante 5
minutos para liberar el aptámero del complejo aptámero/proteína. La resina se elimina por centrifugación, y se
recoge el eluato que contenía el aptámero liberado. Se neutralizan 80 ul de eluato y se tamponan con 20 ul de
35 tampón de neutralización (HCl 8 mM, Tris-HCl 0,5 mM (pH 7,5), 0,1 % de Tween-20). El aptámero se detecta como
se describe en el Ejemplo 4.

Ejemplos en las publicaciones y limitaciones citadas relacionadas con las mismas pretenden ser ilustrativos y no
exclusivos. Otras limitaciones de las publicaciones citadas serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras
una lectura de la memoria descriptiva y un estudio de los dibujos.

40 Las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" deben interpretarse de forma incluyente, en vez de
excluyente.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de la cantidad de una molécula diana que puede estar presente en una muestra de ensayo, comprendiendo el método:

- (a) preparar una mezcla poniendo en contacto la muestra de ensayo con un aptámero que comprende una primera marca y que tiene una afinidad específica por la molécula diana, en donde si dicha molécula diana está presente en dicha muestra de ensayo, se forma un complejo de afinidad con el aptámero no covalente del aptámero y la molécula diana, en donde la tasa de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la molécula diana es mayor de 20 minutos;
- (b) exponer la mezcla a un primer soporte sólido que comprende un primer elemento de captura y dejar que la primera marca se asocie al primer elemento de captura;
- (c) eliminar cualquier componente de la mezcla no asociado a dicho primer soporte sólido;
- (d) liberar el complejo de afinidad por aptámero de dicho primer soporte sólido;
- (e) unir una segunda marca a dicha molécula diana en el complejo de afinidad por aptámero;
- (f) exponer el complejo de afinidad por aptámero liberado a un segundo soporte sólido que comprende un segundo elemento de captura y dejar que la segunda marca se asocie a dicho segundo elemento de captura;
- (g) eliminar cualquier aptámero sin complejar de dicha mezcla por separación del aptámero sin complejar de dicho complejo de afinidad por aptámero; y
- (h) disociar el aptámero de dicho complejo de afinidad por aptámero y recoger aptámeros libres;
- (i) detectar la cantidad de aptámeros libres recogidos y cuantificar dicha diana cuantificando dichos aptámeros.

2. El método de la reivindicación 1, en el que:

- a. la primera marca es la misma que la segunda marca y la segunda marca se añade a la molécula diana en cualquier momento después de (b) y antes de (f), y que comprende bloquear el primer agente de captura antes de la adición de la segunda marca; o bien
- b. la primera marca es diferente de la segunda marca y la segunda marca se añade a la molécula diana en cualquier momento antes de (f).

3. El método de la reivindicación 1, que comprende además introducir una exposición cinética en cualquier momento después de (a) y antes de (d).

4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha exposición cinética comprende diluir la mezcla que contiene el complejo de afinidad por aptámero y/o añadir un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad por aptámero e incubar la mezcla que contiene el complejo de afinidad por aptámero durante un tiempo que:

- a. está seleccionado del grupo que consiste en más de o igual a aproximadamente 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, y 60 minutos; o bien
- b. es tal que aumente la relación del nivel medido de complejo de afinidad por aptámero con respecto al nivel medido de complejo no específico.

5. El método de la reivindicación 3, en el que la exposición cinética comprende la introducción de una molécula competidora y dicha molécula competidora está seleccionada del grupo que consiste en un oligonucleótido, heparina, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón, sulfato de dextrano, polianión, polímero de fosfodiéster abásico, dNTP y pirofosfato.

6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha tasa de disociación ($t_{1/2}$):

- a. es superior o igual a aproximadamente 30 minutos;
- b. es de entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 240 minutos;
- c. está seleccionada del grupo que consiste en $\geq$ aproximadamente 30 minutos, $\geq$ aproximadamente 60 minutos, $\geq$ aproximadamente 90 minutos, $\geq$ aproximadamente 120 minutos, $\geq$ aproximadamente 150 minutos, $\geq$ aproximadamente 180 minutos, $\geq$ aproximadamente 210 minutos y $\geq$ aproximadamente 240 minutos.

7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho aptámero se cuantifica usando un método seleccionado del grupo que consiste en EM e hibridación.

8. El método de la reivindicación 1, que comprende además añadir al aptámero un resto detectable.

9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho resto detectable está seleccionado del grupo que consiste en un colorante, un punto cuántico, una radioetiqueta, un grupo funcional electroquímico, una enzima y un sustrato enzimático.

10. El método de la reivindicación 9, en el que:

- a. dicho colorante es un colorante fluorescente; o bien
- b. dicha enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

11. El método de la reivindicación 1, en el que dicho aptámero es un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario.

12. El método de la reivindicación 1, en el que dicho aptámero comprende ADN, ARN o tanto ADN como ARN

13. El método de la reivindicación 1, en el que dicho aptámero comprende al menos una modificación química.

14. El método de la reivindicación 13, en el que dicha al menos una modificación química es:

- a. una sustitución química en una o más posiciones independientemente seleccionadas de una posición de ribosa, una posición de desoxirribosa, una posición de fosfato y una posición de base; o bien
- b. está seleccionada independientemente del grupo enumerado en la figura 16.

15. El método de la reivindicación 1, en el que dicha molécula diana está seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un polisacárido, una glucoproteína, una hormona, un receptor, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un sustrato, un metabolito, un análogo del estado de transición, un cofactor, un inhibidor, un fármaco, un colorante, un nutriente, un factor de crecimiento, un tejido y una sustancia controlada.

16. El método de la reivindicación 1, en el que dicha molécula diana es una proteína o un péptido.

17. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra de ensayo:

- a. está seleccionada del grupo que consiste en una muestra biológica, una muestra ambiental, una muestra química, una muestra farmacéutica, una muestra alimentaria, una muestra agrícola y una muestra veterinaria
- b. es una muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aliento, orina, semen, saliva, líquido meníngeo, líquido amniótico, líquido glandular, líquido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado de articulación, células, un extracto celular, heces, tejido, un extracto de tejido, una biopsia de tejido y líquido cefalorraquídeo; o
- c. es plasma o suero.

18. El método de la reivindicación 1, en el que:

- a. dicha primera marca y dicha segunda marca comprenden cada una al menos un componente independientemente seleccionado del grupo que consiste en un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un affibody, un mimético de anticuerpo, un receptor de célula, un ligando, un lípido, biotina, avidina, estreptavidina, extravidina, neutravidina, un metal, histidina y cualquier porción de cualquiera de estas estructuras;
- b. dicho primer elemento de captura y dicho segundo elemento de captura comprenden cada uno al menos un componente independientemente seleccionado de un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un affibody, un mimético de anticuerpo, un receptor de célula, un ligando, un lípido, biotina, avidina, estreptavidina, extravidina, neutravidina, un metal, histidina y cualquier porción de cualquiera de estas estructuras;
- c. dicho primer soporte sólido y segundo soporte sólido está cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en una perla de polímero, una perla de agarosa, una perla de poliestireno, una perla de acrilamida, un perla de núcleo sólido, una perla porosa, una perla paramagnética, perla de vidrio, perla de poro controlado, un pocillo de microtítulo, un sustrato de copolímero de ciclo-olefina, una membrana, un sustrato de plástico, nailon, una película de Langmuir-Blodgett, vidrio, un sustrato de germanio, un sustrato de silicio, un chip de oblea de silicio, un flujo a través del chip, una microperla, un sustrato de politetrafluoroetileno, un sustrato de poliestireno, un sustrato de arseniuro de galio, un sustrato de oro y un sustrato de plata.

19. El método de la reivindicación 1, en el que la detección del aptámero comprende hibridar el aptámero con un tercer soporte sólido, en donde el tercer soporte sólido comprende una pluralidad de características direccionables y en donde al menos una de dichas características comprende al menos un elemento de captura dispuesto encima que es complementario a cualquier secuencia contenida dentro del aptámero.

20. Un método de determinación de la cantidad de una molécula diana en una muestra, comprendiendo el método:

- i. proporcionar una pluralidad de aptámeros a una molécula diana, en donde los aptámeros tienen una marca de captura escindible y en donde la tasa de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la molécula diana es mayor de 20 minutos;
- ii. poner en contacto los aptámeros con una muestra que contiene moléculas diana para formar una mezcla que contiene complejos aptámero-molécula diana no covalentes;

- iii. proporcionar un soporte sólido que tiene sondas adheridas a la superficie del soporte, en donde las sondas son capaces de unirse a la marca de captura escindible;
 - iv. poner en contacto la mezcla con el soporte sólido de forma que los complejos aptámero-molécula diana lleguen a unirse al soporte mediante la unión de la marca de captura escindible y la sonda;
 - 5 v. separar los complejos aptámero-molécula diana unidos al soporte sólido del resto de la mezcla;
 - vi. introducir una segunda marca de captura al componente de molécula diana de los complejos aptámero-molécula diana;
 - vii. disociar los complejos aptámero-molécula diana de la superficie del soporte sólido escindiendo las marcas de captura escindibles;
 - 10 viii. proporcionar un soporte sólido que tiene sondas adheridas a la superficie del soporte, en donde las sondas son capaces de unirse a la segunda marca de captura sobre moléculas diana;
 - ix. poner en contacto los complejos aptámero-molécula diana disociados con el soporte sólido de (viii) de forma que los complejos aptámero-molécula diana lleguen a unirse al soporte mediante la unión de la segunda marca de captura y la sonda;
 - 15 x. disociar los complejos aptámero-molécula diana para dar aptámeros libres y moléculas diana unidas al soporte;
 - xi. medir la cantidad de aptámero libre.
21. El método de la reivindicación 20, en el que después de la disociación de los complejos aptámero-molécula diana de la superficie del soporte sólido (vii), los complejos aptámero-molécula diana disociados:
- 20 a. se ponen en contacto con un exceso de molécula competidora; y/o
 - b. se diluyen.

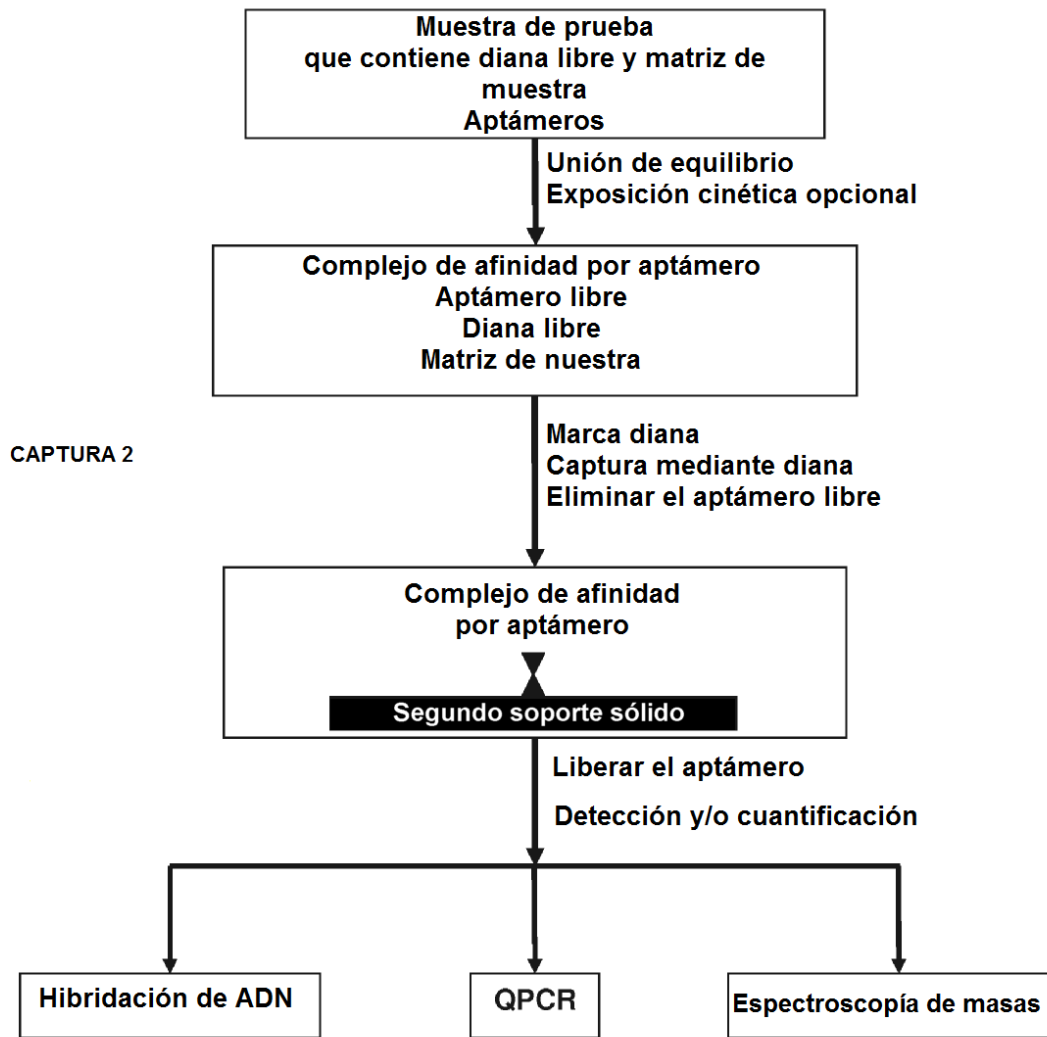


Figura 1A

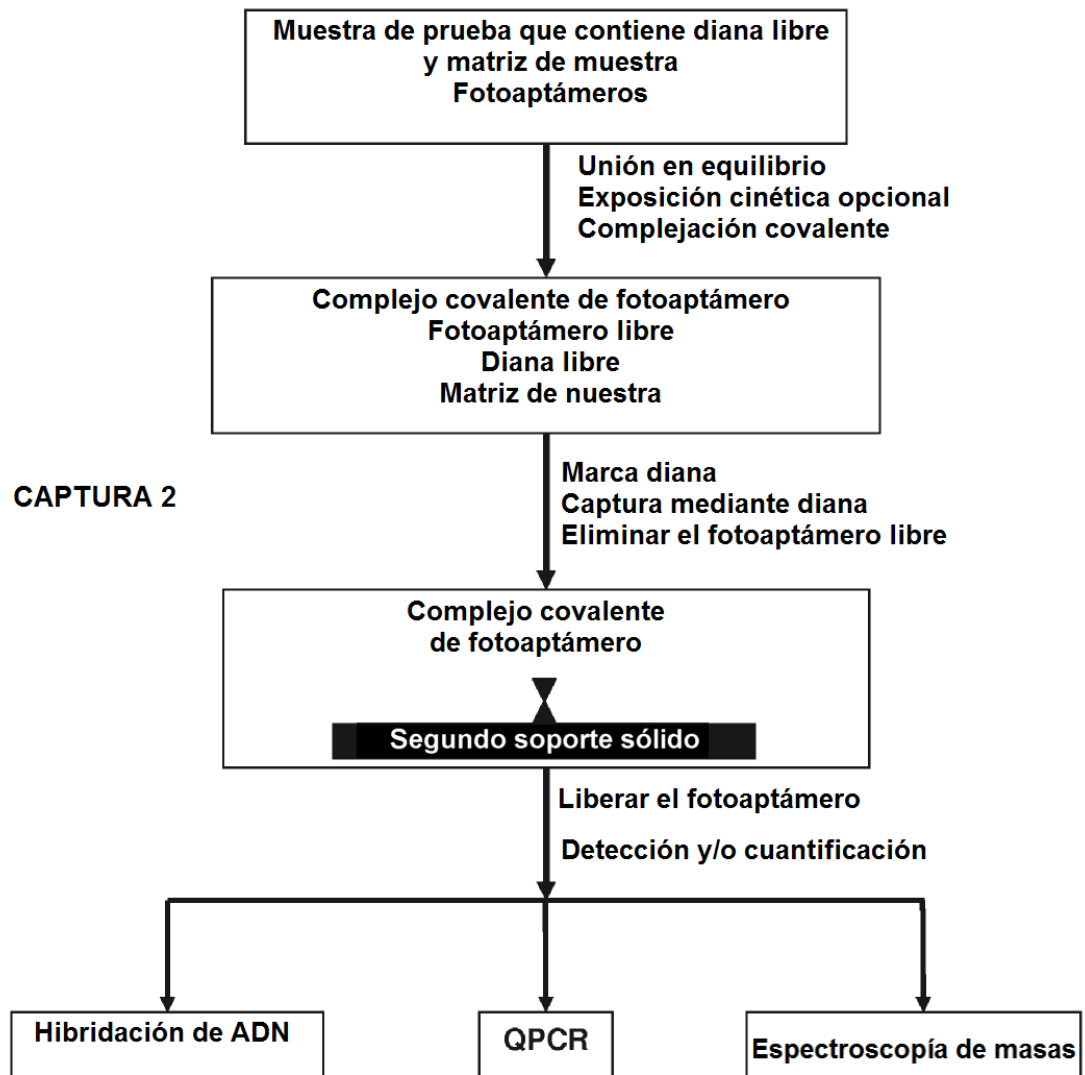


Figura 1B

FIGURA 2A

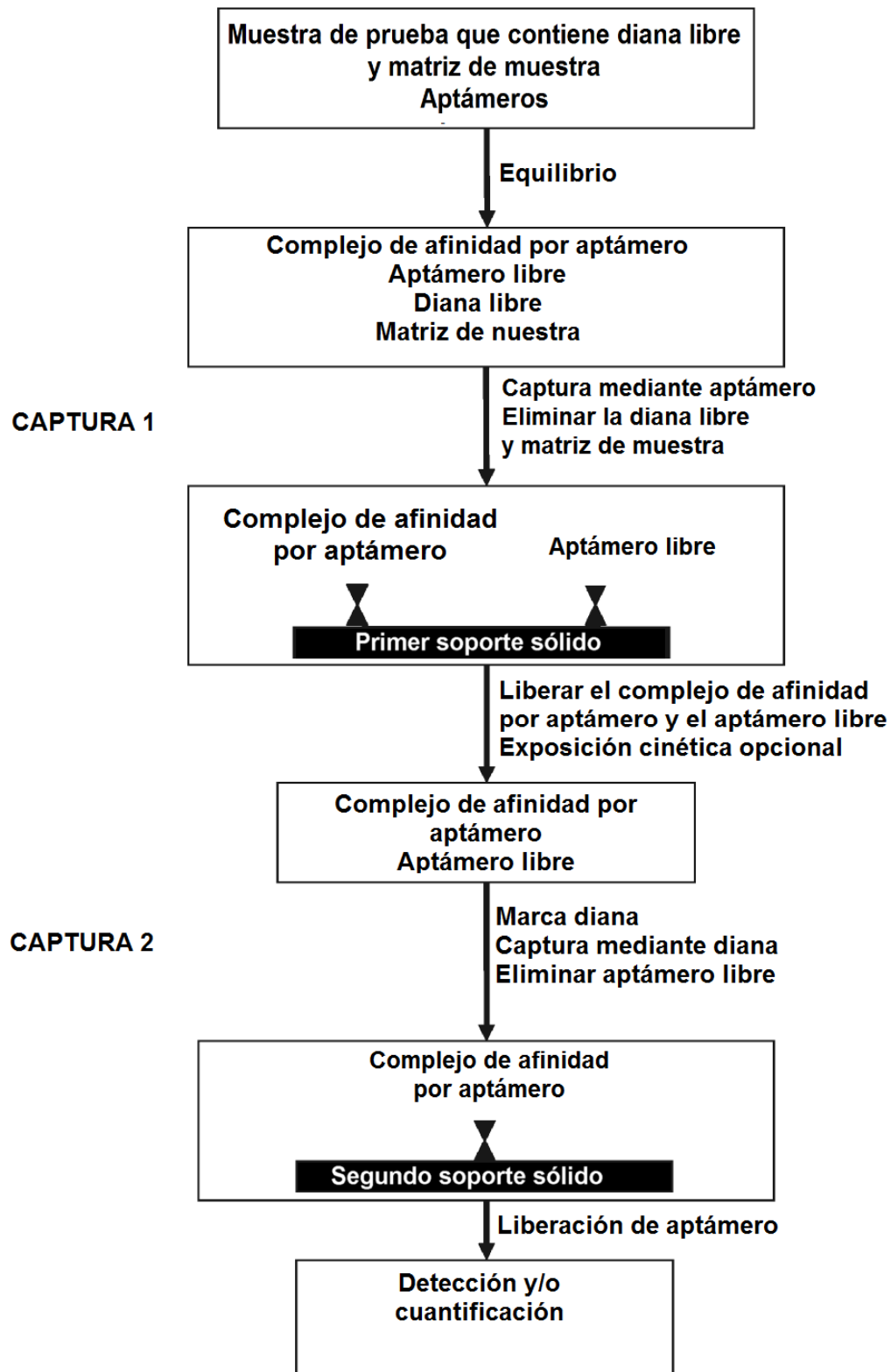
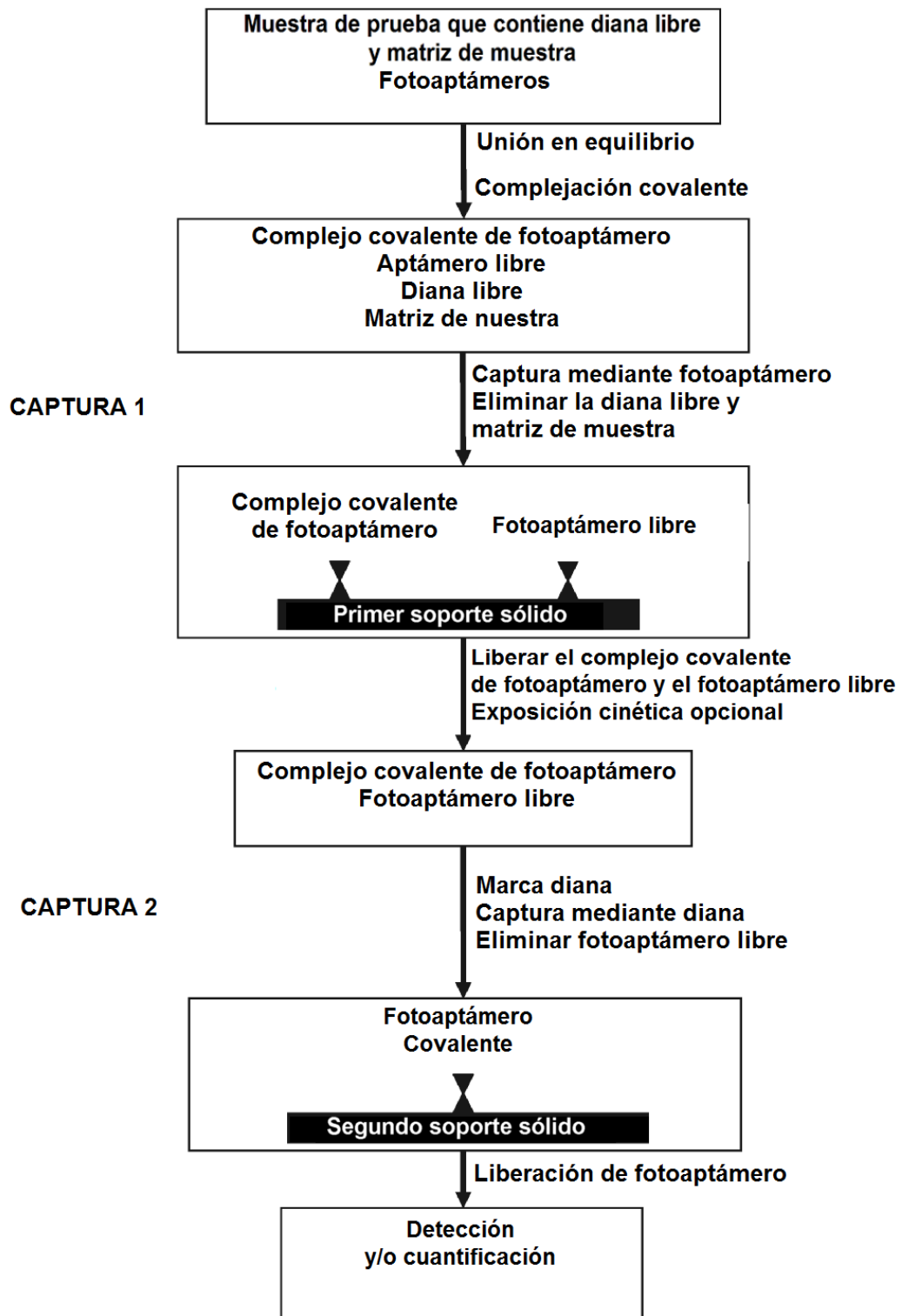


FIGURA 2B



Construcción de una captura

Afinidad

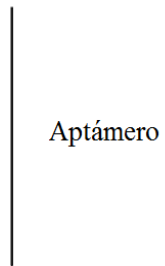


FIG. 3A

Fotorreticulación

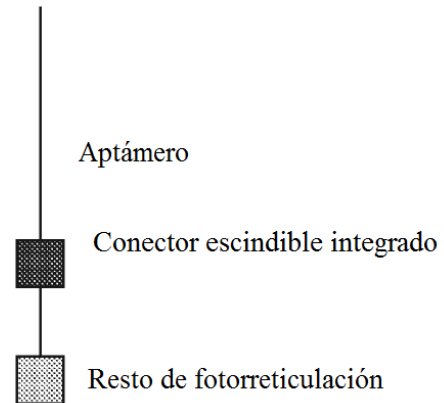


FIG. 3B

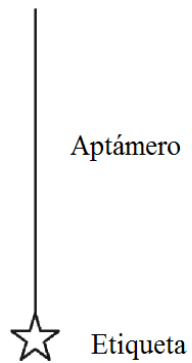


FIG. 3C

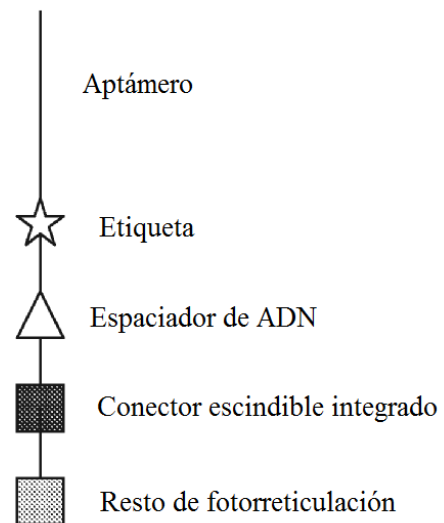


FIG. 3D

Construcciones de dos capturas

Afinidad

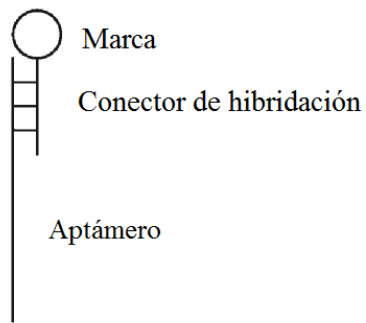


FIG. 3E

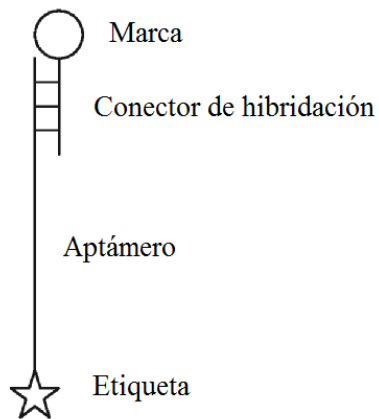


FIG. 3G

Fotorreticulación

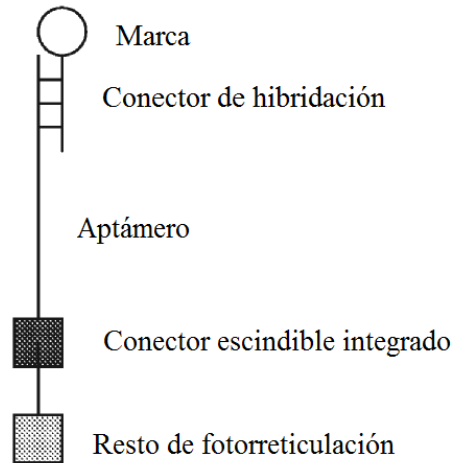


FIG. 3F

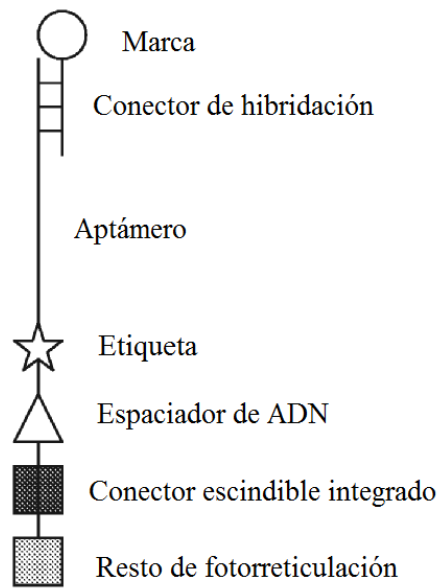


FIG. 3H

Construcciones de dos capturas

Afinidad

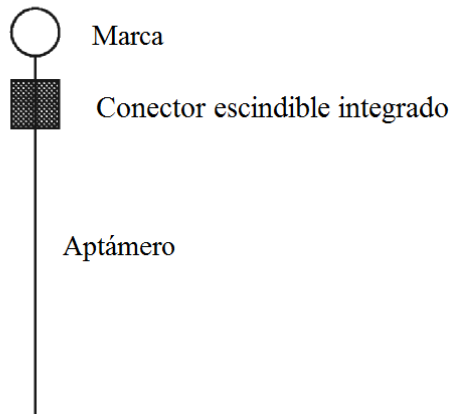


FIG. 3I

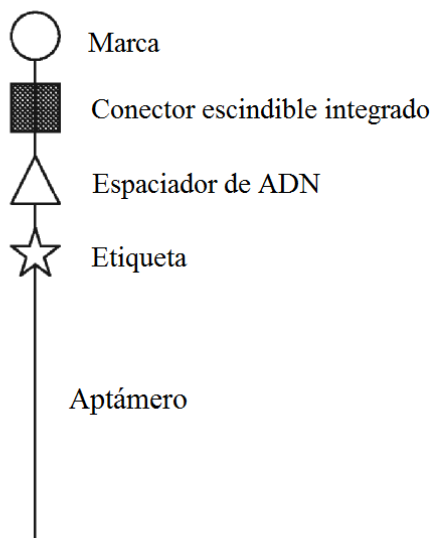


FIG. 3K

Fotorreticulación

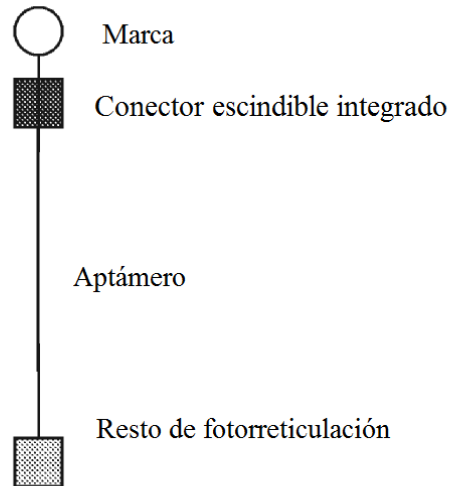


FIG. 3J

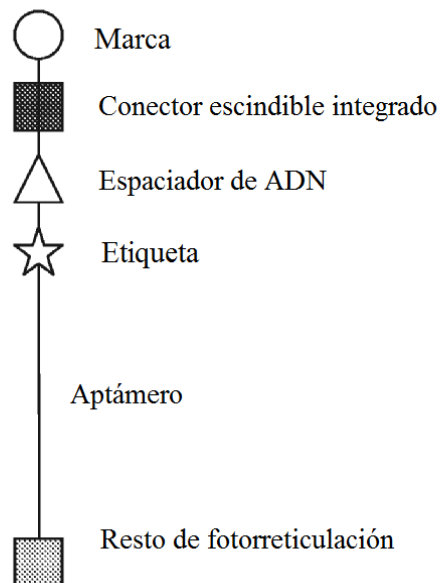


FIG. 3L

Figura 4

4-1BB	C4	Citocromo P450 3A4	GAS1
Ligando 4-1BB	C4b	DAN	GASP-2
6Ckine	C5	DARPP-32	G-CSF-R
a1 -Antiquimotripsina	C5a	DC-SIGN	GDF-9
a2-Antiplasmina	C5b, 6 Complejo	DC-SIGN R	GDF-11
ACE2	C6	D-dímero	GDNF
Proteína C activada	C7	Proteína 19B de caja DEAD	GFAP
Activina A	C8	Desmogleína -1	GFRA-1
Activina RIA	C9	DKK1	GFRA-2
Activina RIB	Cadherina E	DLL4	GFRA-3
ADAMTS-4	Cadherina-5	Dopa descarboxilasa	GIB
ADAMTS-5	Calcineurina B a	DRG-1	GIIE
Agrecano	Calpaina I	DRR1	GITR
AIF1	Calpastatina	Dtk	Receptor de glucocorticoides
ALCAM	Anhidrasa carbónica IV	EDA (A2)	Glutamato carboxipeptidasa
ALK-1	Cardiotrofina-1	EDAR	Glutatión S-transferasa pi
Fosfatasa alcalina, hueso	Caspasa-3 (pro)	EG-VEGF	Glipicano 3
AMPM2	Catalasa	eIF-5	gp130, soluble
Proteína precursora de amiloide	Catepsina A	Elastasa	GPC2
Angiogenina	Catepsina B	EMAP-2	GPVI
Angiopoyetina-1	Catepsina D	EN A-78	Granulinsina
Angiopoyetina-2	Catepsina G	Endostalina	Granzima B
Angiopoyetina-4	Catepsina S	Eotaxina	Gro-a
ANGL3	Catepsina V	Eotaxina-2	Gro-g
ANGL4	CCL28	Eotaxina-3	Receptor de la hormona de crecimiento
Apo A-1	CD5L	Efrina-A4	GSK-3 beta
ApoB	CD22	Efrina-A5	GV
Apo E	CD23	Efrina-B3	GX
Apo E2	CD30	Cinasa de células epiteliales	HA 1-1
Apo E3	Ligando CD30	EPO-R	Haptoglobina, tipo mixto
Apo E4	ANTIGENO CD36	ER	Hat1
APRIL	CD39	ERBB1	HB-EGF
AREG	CD97	ERBB2	HCC-1
ARG11	CD 109	ERBB3	HCC-4
ARSB	Ceruloplasmina	ERBB4	HDAC8
ART	CFC1	ERK-1	Hemopexina
Artemina	Chk1	ESAM	Cofactor II de heparina
ASAH2	Ck-b-8-1	Factor B	HGF
ASAH1	CK-BB	Factor D	Histona H1.2
ATS1	CK-MM	Factor H	HIV-2 Rev
ATS13	Complejo CLF-1/CLC	Factor I	HMG-1
Aurora cinasa A	CMP-ácido siálico sintetasa	Ligando Fas, soluble	HO-2
Azurocidina	CNTF	Fas, soluble	HPLN1
B7	CNTFR alfa	FCG2A	HPV E7 tipo 16
B7-2	CNTN2	FCG2B	HPV E7 tipo 18
BAFF	Factor de coagulación a-XIIa	FCG3B	HSP60
BCAM	Factor de coagulación IX	FCGR1	HSP70
b-Catenina	Factor de coagulación IXab	Ferritina	HSP90a
Bcl-2	Factor de coagulación V	FGF-4	HSP90b
BCMA	Factor de coagulación VII	FGF-5	HTRA2
BDNF	Factor de coagulación X	FGF-6	HVEM
b-Endorfina	Factor de coagulación Xa	FGF7	111 RA
bFGF	Factor de coagulación XI	FGF-8B	I12R2
bFGF-R	Factor de coagulación XIa	FGF9	I-309
BGH3	Factor de coagulación XIII	FGF-10	iC3b
b-Glucosidasa	Colágeno tipo I	FGF-16	ICOS
BGN	COLEC12	FGF-17	IDE
BLC	COMMD7	FGF-18	IDS
BMP-7	Contactina-1	FGF-19	IDUA
BMP-14	Contactina-4	FGF-20	IFN-g
BMPER	COX-2	FGFR-2	IFN-g R1
BMPR1A	Cripto	Fibrinógeno	IFN-lambda 1
BMPRII	CRIS3	Fibronectina	IFN-lambda 2
b-NGF	CRP	Flt-3	IgE
Proteoglicano II óseo	CTACK	Ligando Flt-3	IGFBP-1
BPI	CTGF	Fractalcina / CX3CL-1	IGFBP-2
C1q	CTLA-4	FSH	IGFBP-3
C1r	CXCL16, soluble	FST	IGFBP-4
C2	Cistatina C	FYN	IGFBP-5
C3	Cistatina M	Proteína GA733-1	IGFBP-6
C3a	CYTD	Galectina-2	IGFBP-7
C3adesArg	CYTF	Galectina-3	IGF-1
C3b	CYTN	Galectina-4	IGF-IsR
C3d	Citocromo c	Galectina-7	Receptor de IGF-II

Figura 4 continuación

IgM	Lisozima	P-cadherina	SPINT2
IL-1b	LYVE1	PCNA	Espondina-1
IL-1 R AcP	Receptor de manosa de macrófagos	PDGFRb	sRAGE
IL-1 R4	MAPK14	PDGF-AA	sRANKL
IL-1 sRI	MATN2	PDGF-BB	sTie-1
IL-1F7	MATN3	PD-L2	sTie-2
IL-1Rrp2	MBL	PDPK1	sTREM-1
IL-2	MCP-1	PECAM-1	STX1a
IL-2sRg	MCP-2	Persefina	Sulfotransferasa, factor Nod
IL-4	MCP-3	PF-4	suPAR
IL-4sR	MCP-4	PGRP-S	TAC1
IL-6	M-CSF R	PIGR	TARC
IL-6sRa	MDC	PKB	tau
IL-7	MEK1	PKC-A	TBP
IL-7R alfa	MEPE	PKC-B-II	TECK
IL-8	MER	PKC-D	Tenastina
IL-10	Met	PKC-Z	Testicano-2
IL-10 Rb	METAP1	Plasmina	TF
IL-11	MiA	Plasminógeno	TFPI
IL-12	MICA	PIGF	TGF-b1
IL-12 Rb1	Midkina	Precalcreína	TGF-b2
IL-13	Mif4gd, ratón	PRL	TGF-b RII
IL-13 Ra1	MIG	Properdina	Trombina
IL-15 Ra	Miox, rata	Fosfatasa ácida prostática	Globulina de unión a tiroxina
IL-16	MIP-1a	Proteasa nexina I	TIG2
IL-17sR	MIP-1b	Proteína C	TIMP-1
IL-17B	MIP-3a	Proteína S	TIMP-2
IL-17D	MIP-3b	Protrombina	TIMP-3
IL-17E	MK01	PSA	TNFSR-I
IL-17F	MMP-1	PSA-ACT	TNFSR-II
IL-18 Bpa	MMP-2	P-Selectina	TNFSF15
IL-18 Ra	MMP-3	PSMA	TNFSF18
IL-18 Rb	MMP-7	PTHrP	Tom34
IL-19	MMP-8	PTN	Topoisomerasa I
IL-20	MMP-9	PTP-1B	tPA
IL-21 sR	MMP-13	Inhibidor beta de la disociación de Rab GDP	Tpo
IL-22	MMP-14	Rad	TRAIL
IL-27	MMP-17	RAD51	TRAIL R2
Inosina trifosfatasa	MOZ	RANTES	TRAIL R4
IP-10	MP112	RAP	Transferrina
IR	MPIF-1	RELt	TrATPasa
I-TAC	MSP R	Resistina	TrkB
JAM-B	Mieloperoxidasa	RET	TrkC
JAM-C	Cadena ligera 2 reguladora de miosina	RGMb	Troponina I
Calicreína 4	NADPH-P450 Oxidorreductasa	RGM-C	Troponina T
Calicreína 5	NANOG	S100A4	Tripsina
Calicreína 8	NAP-2	SAP	Tripsina 2
Calicreína 11	NCAM-L1	SARP-2	TSLP
Calicreína 12	NET4	SCD14	TSLPR
Calicreína 13	NEUREGULINA-1	SCFsR	TSP2
Carioferina-a2	Neurotrofina-3	SCGF-alfa	TSP4
Cinínógeno, HMW, una cadena	Neurotrofina-5	SCGF-beta	TWEAK
Cinínógeno, HMW, dos cadenas	NG36	SDF-1a	UBC9
KLH	Nidogen	SDF-1b	Ubiquitina+1
KREM2	NKG2D	Semaforina 3A	ULBP-1
Ku70	NKp30	sE-Selectina	ULBP-2
Lactoferrina	NKp44	SET9	ULBP-3
LAG-1	Noggin	sFRP-3	uPA
Laminina	Receptor de Nogo	sICAM-2	URB
Layilina	NovH	sICAM-3	VCAM-1
LBP	NPS-PLA2	SIGIRR	VEGF
LD78-beta	NRP1	Siglec-6	VEGFsR2
Leptina	OLR1	Siglec-7	VEGFsR3
Lipocalina 2	ON	Siglec-9	VEGF-C
LKHA4	OPG	SLAMF8	VEGF-D
LRIG3	OSM	sLeptina R	Vitronectina
LRP8	Ligando OX40	SLPI	vWF
LSAMP	PAFA H subunidad beta	sL-Selectina	WfKN2
Hormona luteinizante	PAI-1	SMAC	WIF-1
LY86	PAPP-A	sn-1,2-Diacilglicerol cinasa	WISP-3
LY9	PARC	SOD	XEDAR
Linfotactina	Proteína asociada A	Soggy-1	Yes
Linfotoxina b R	Proteína asociada B	Erizo Sónico	

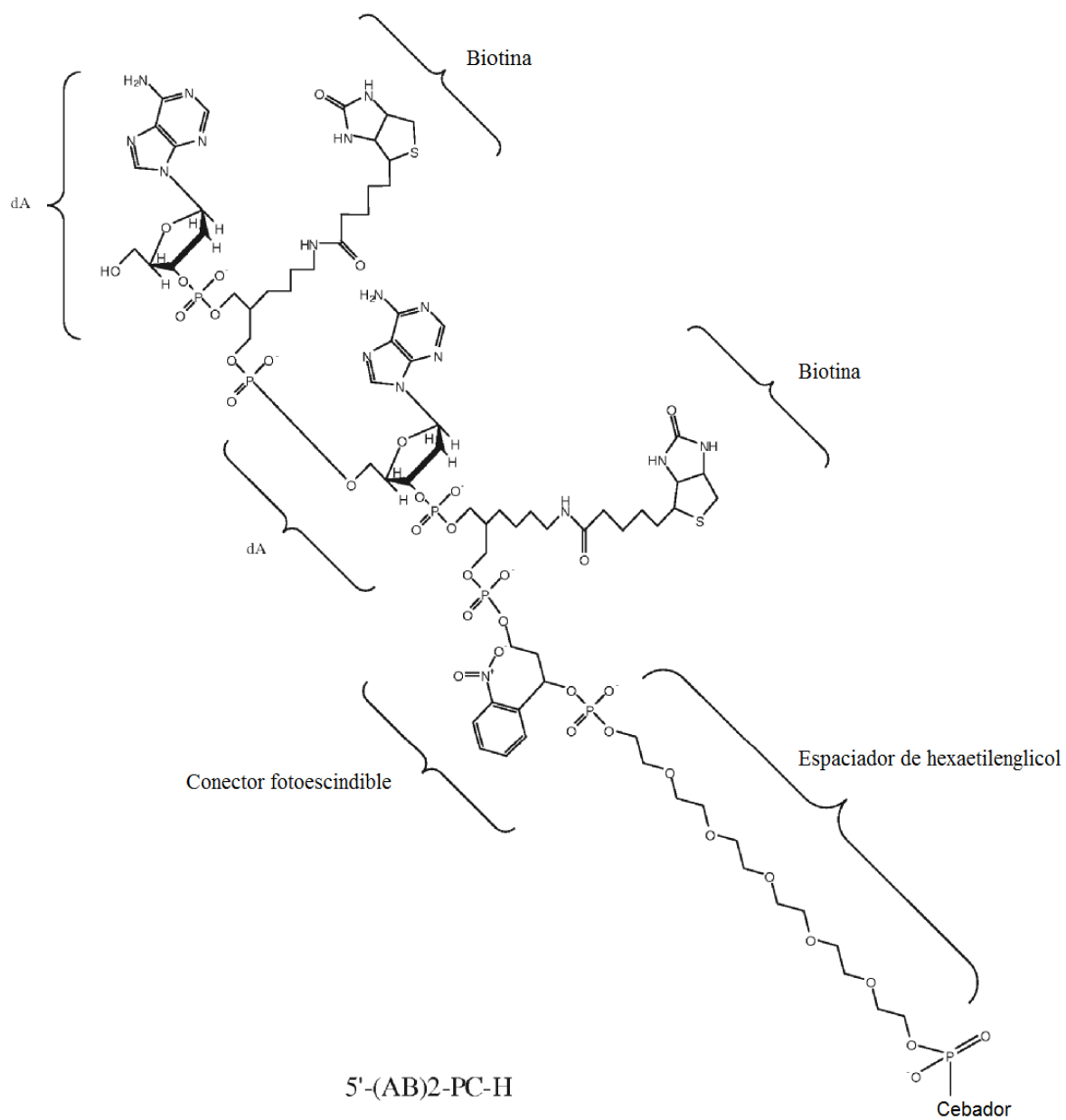
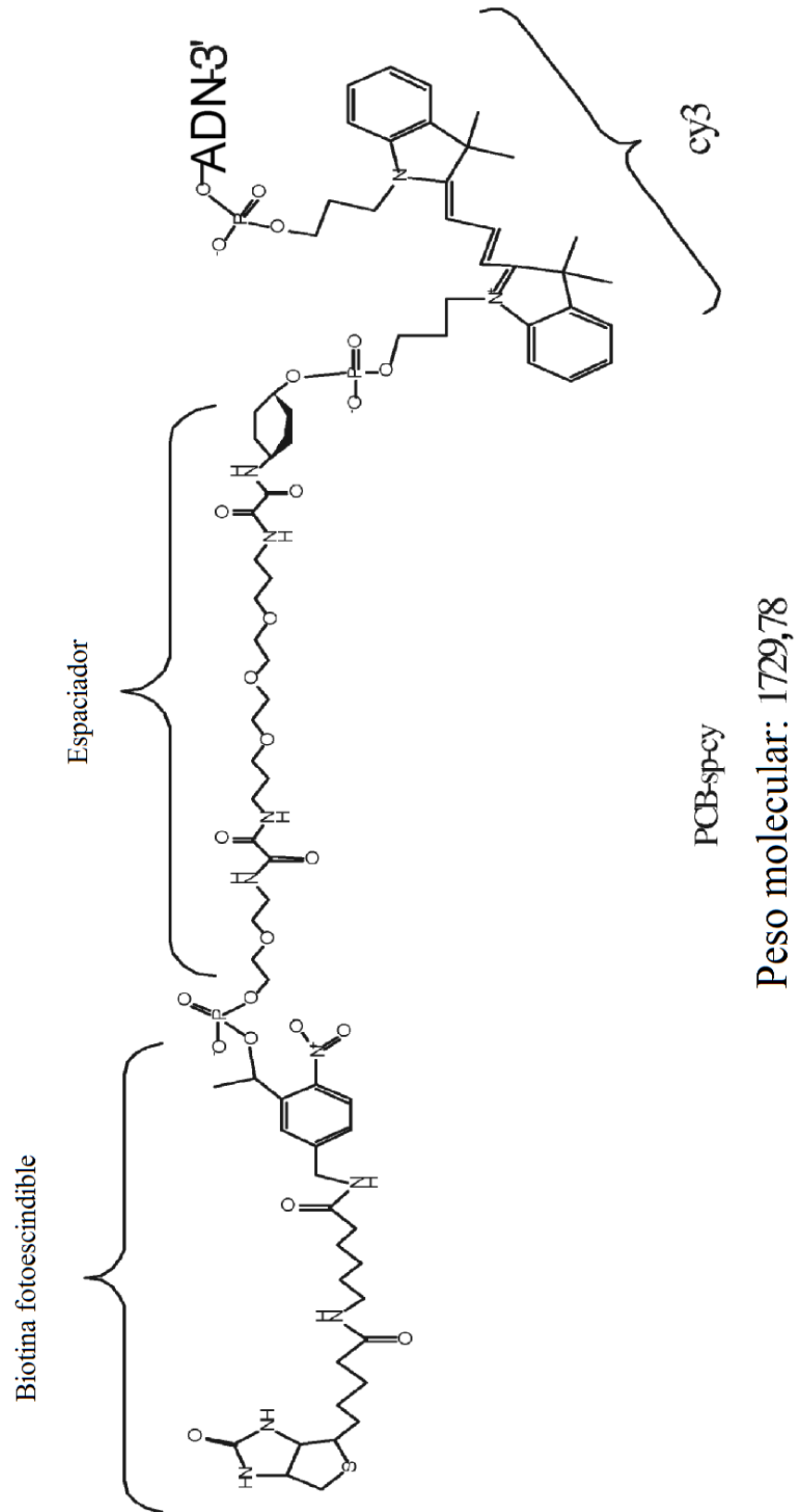


FIG 5A

FIG. 5B



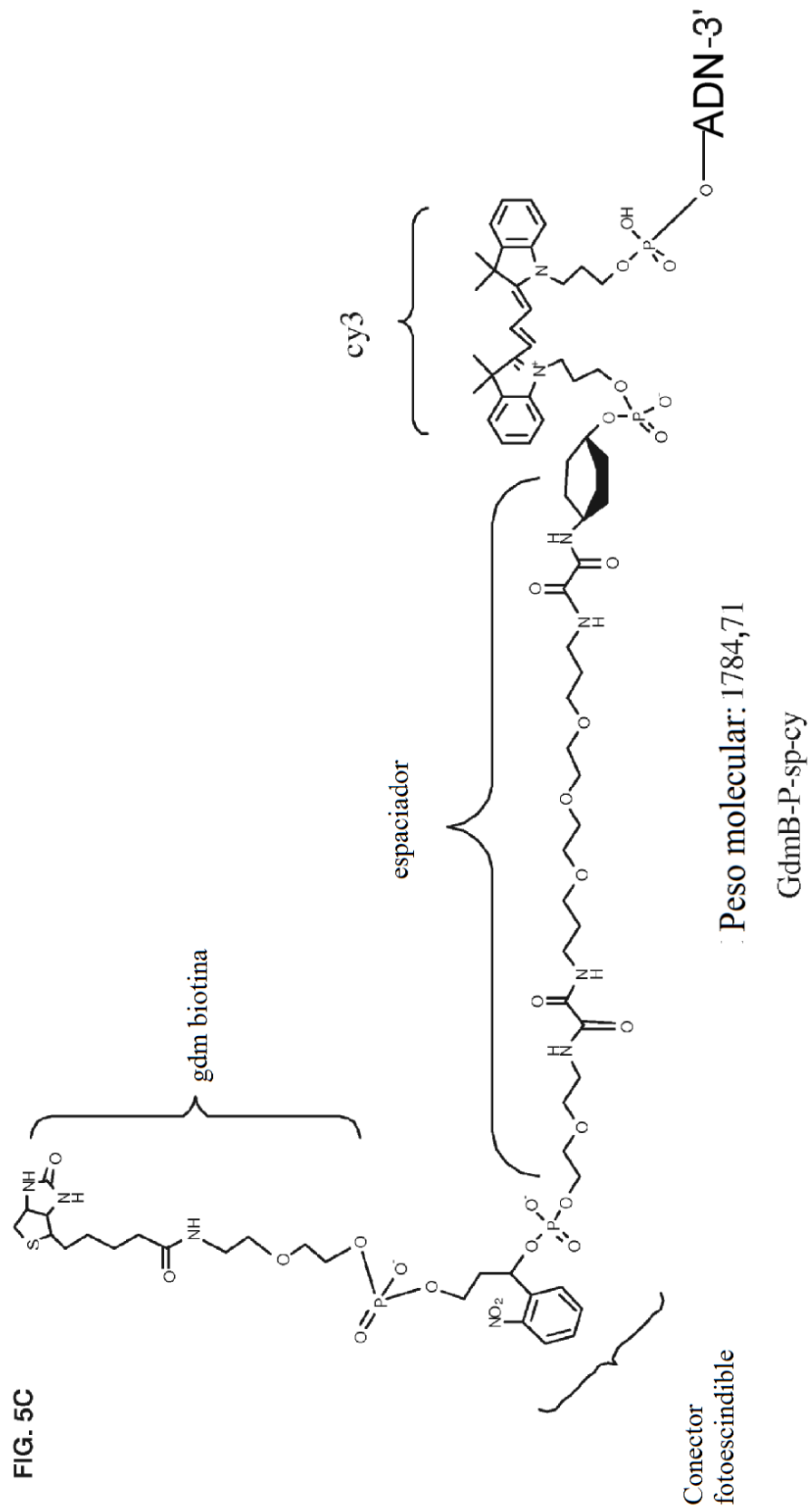
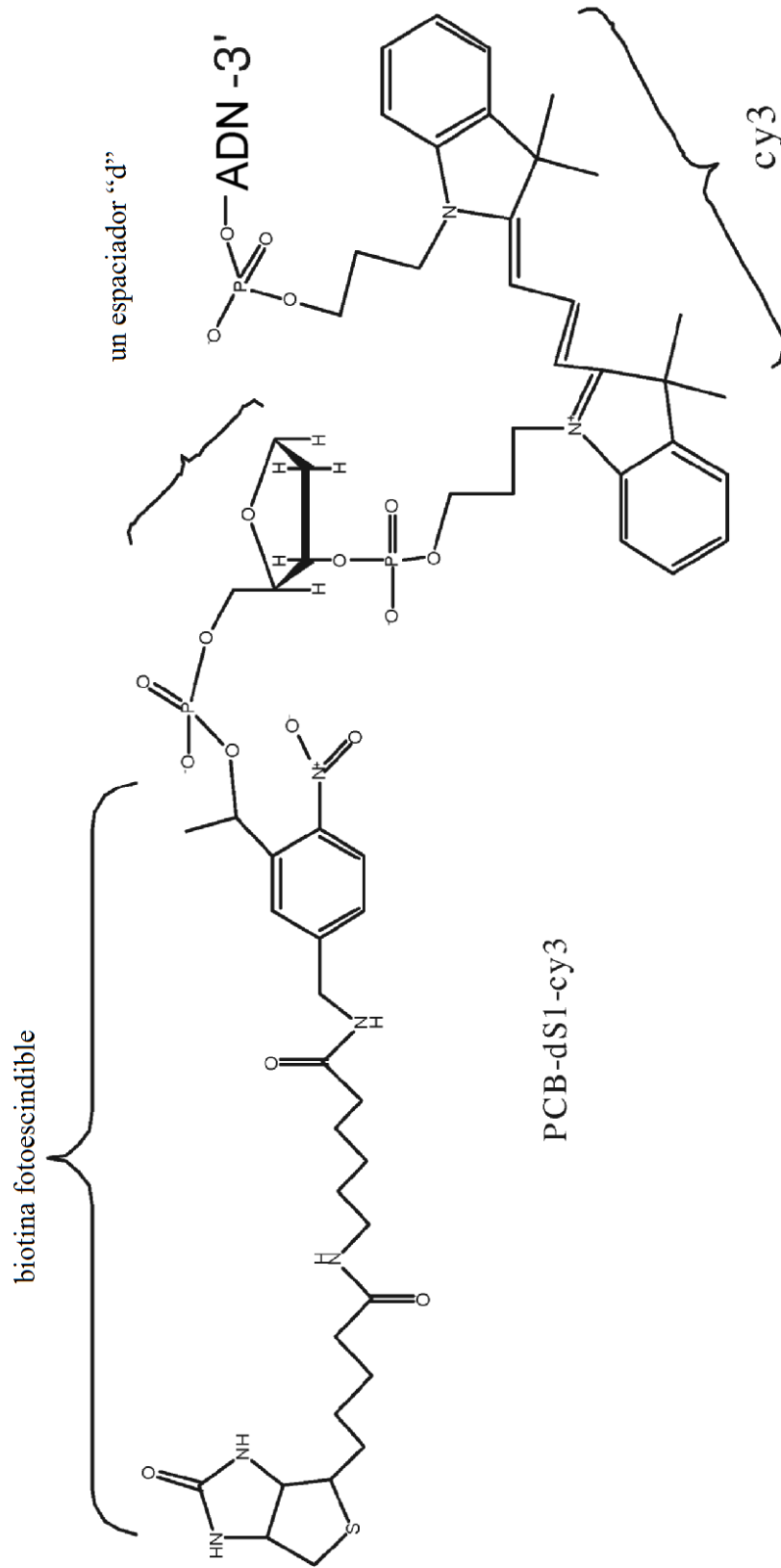


FIG. 5D



Peso molecular: 1299,28

Figura 6

- A** 5' - CY3 – APTÁMERO – 3'
- B** 5' – B- PC- ESPACIADOR- CY3- APTÁMERO
- C** 5' - ANA – PC – ESPACIADOR - CY3 – APTÁMERO
- D** 5' - ANA – PC – ESPACIADOR - CY3 – APTÁMERO – HYB/HYB'-(T)₆-(AB)₂

Figura 7A

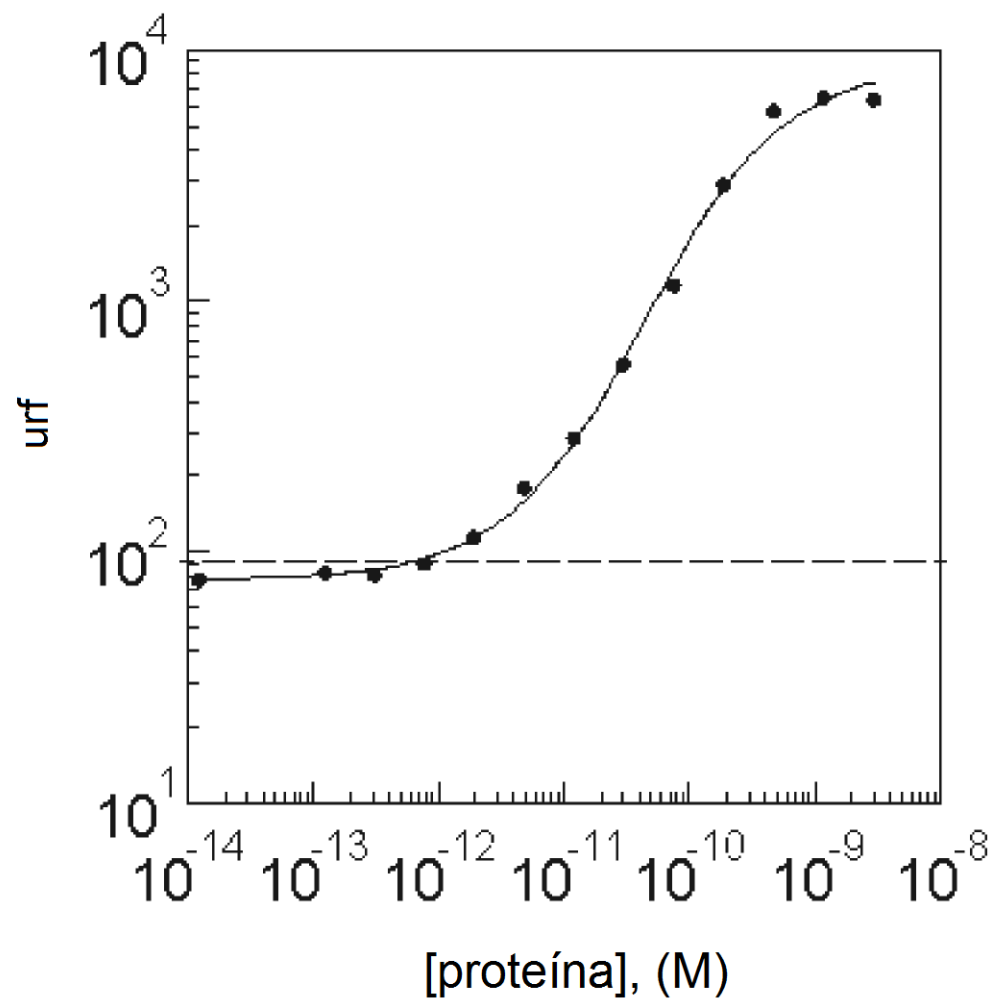


Figura 7B

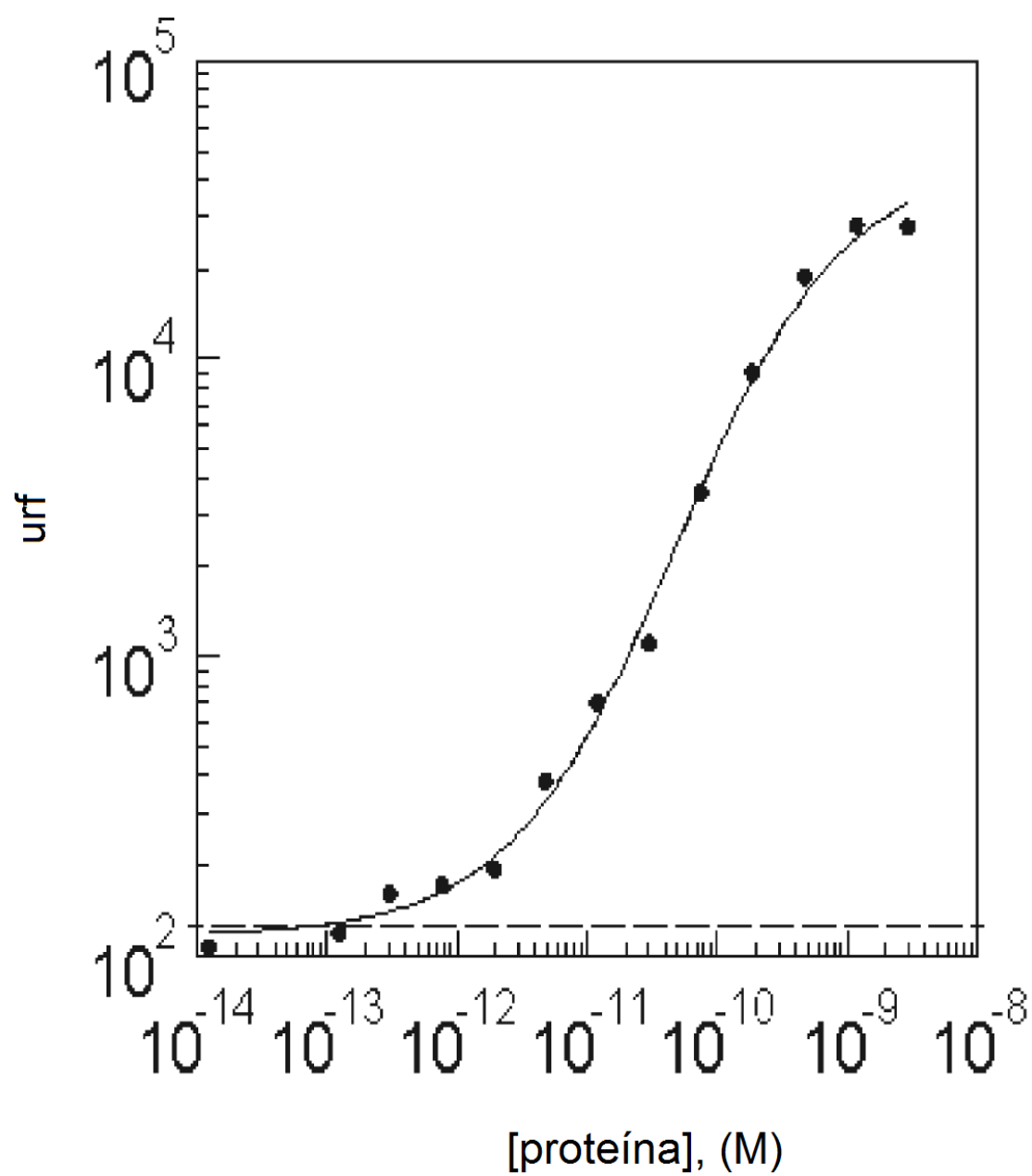


Figura 7C

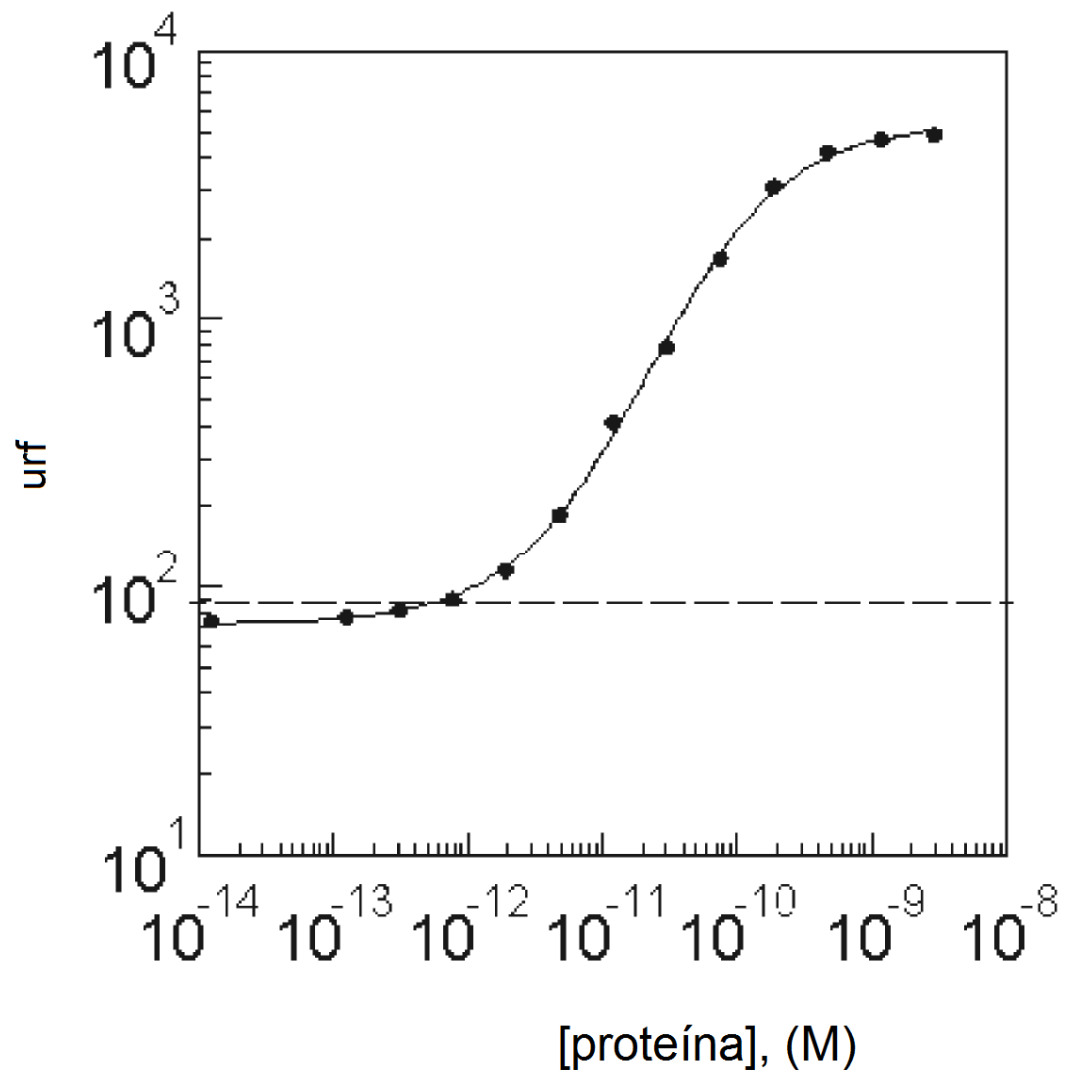


Figura 8

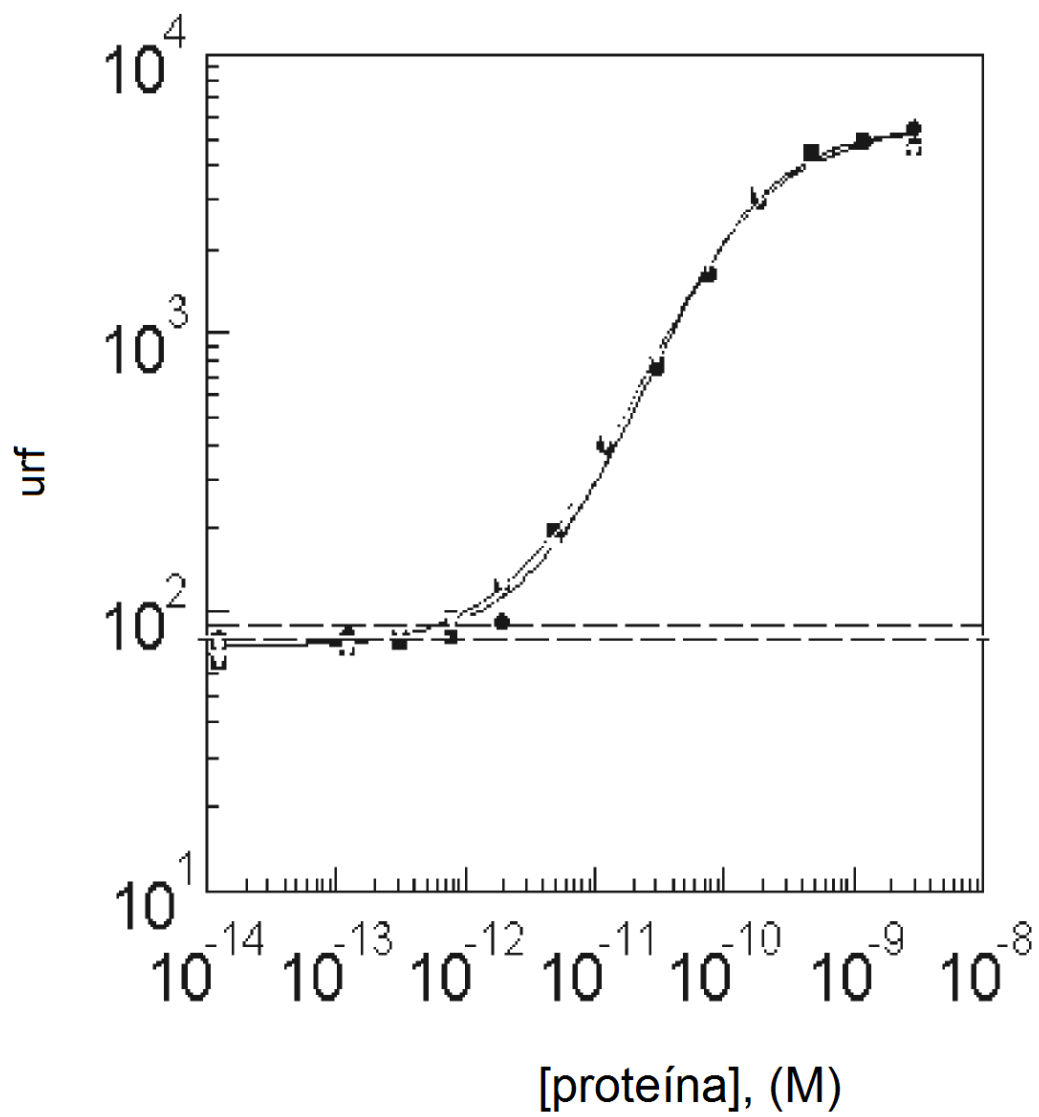


Figura 9

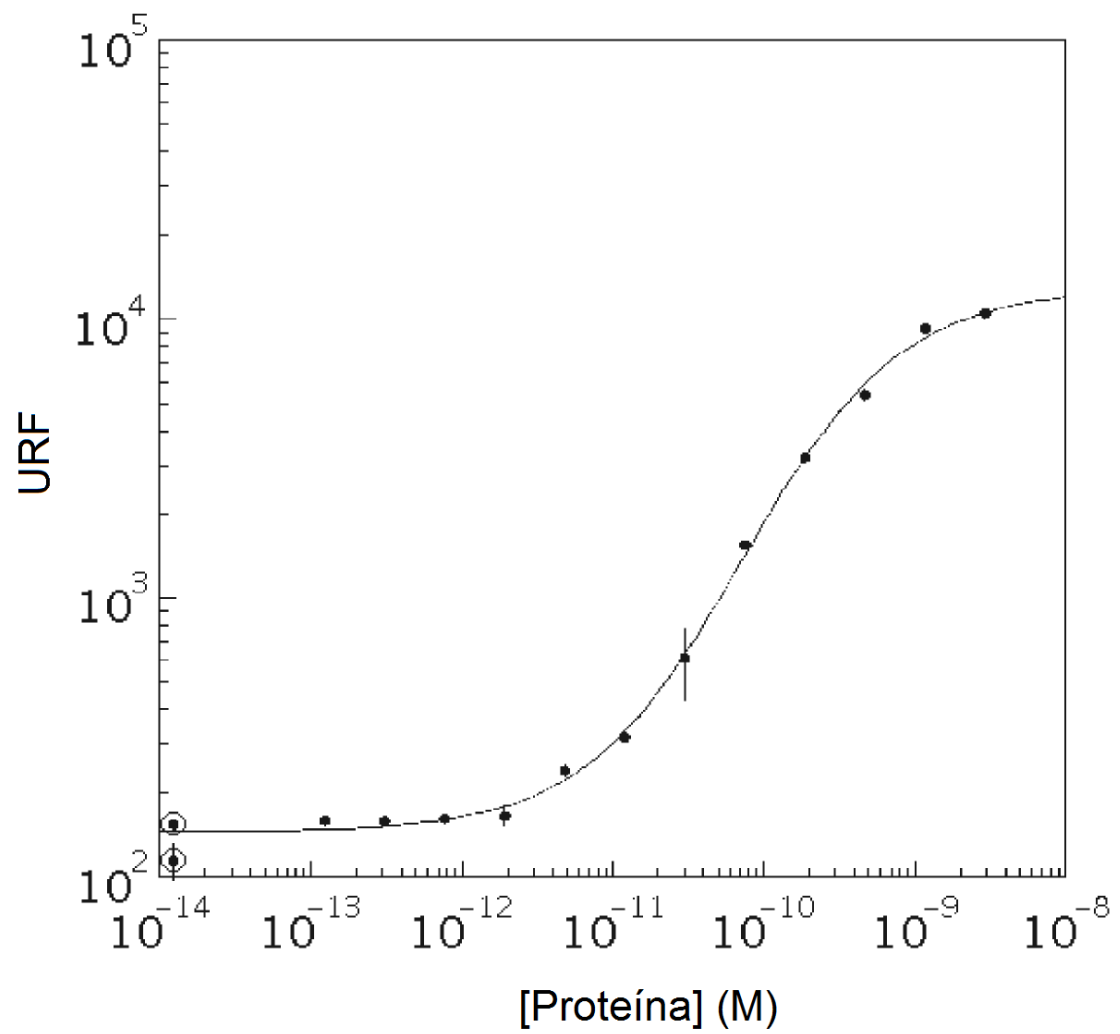


Figura 10

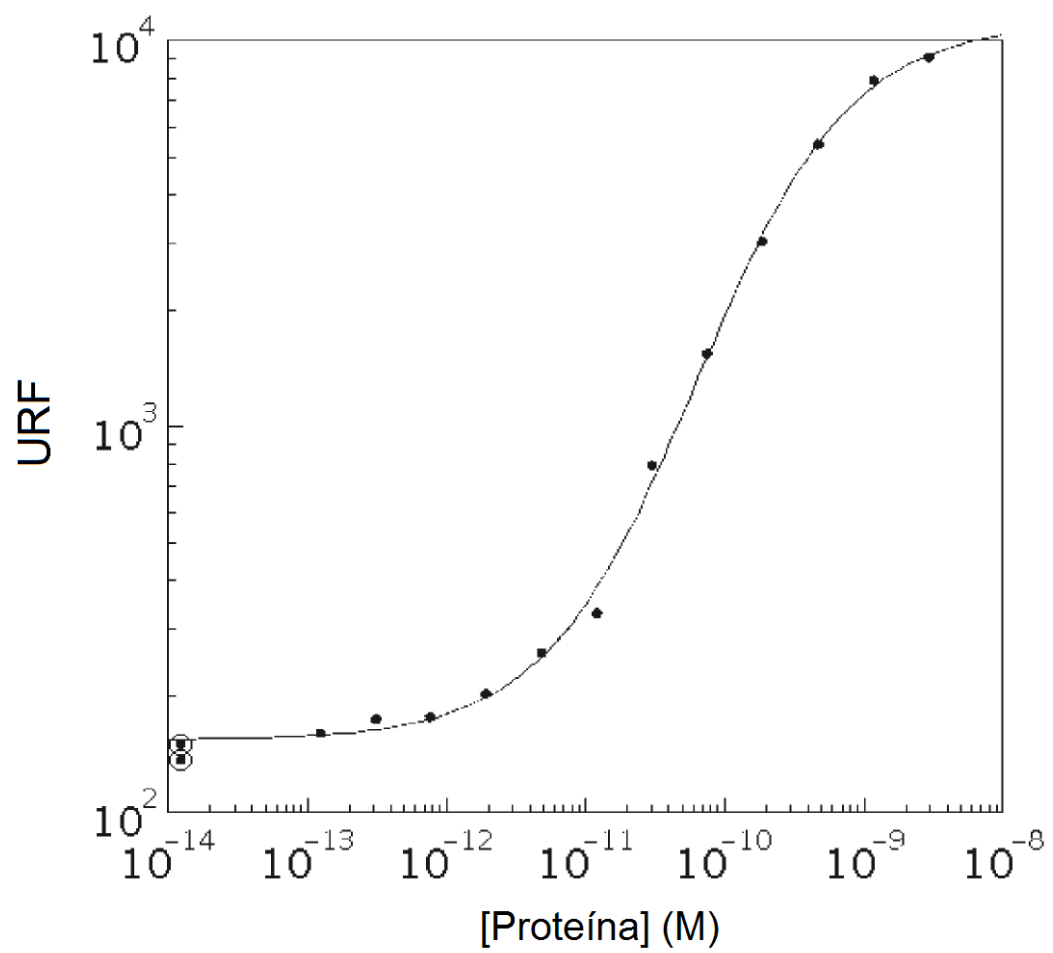


Figura 11

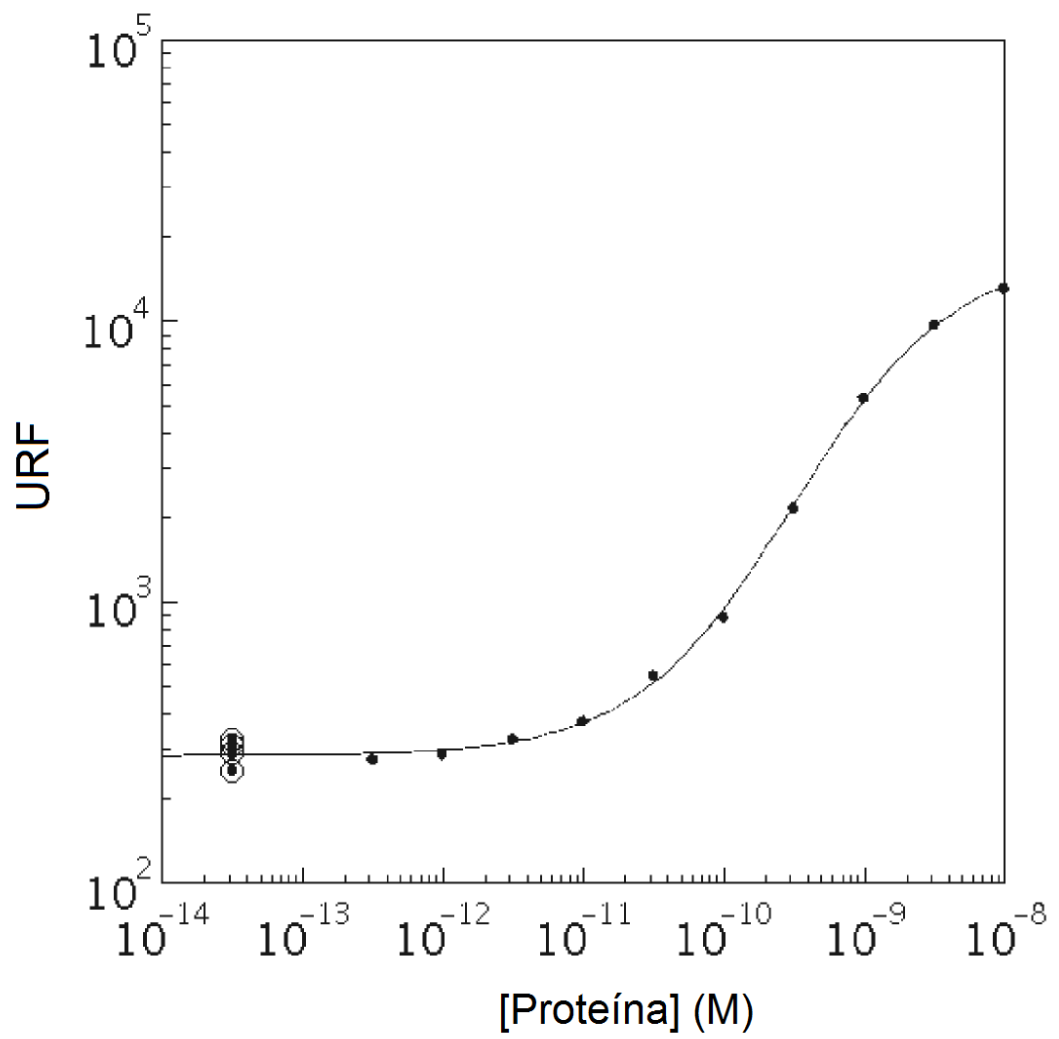


Figura 12

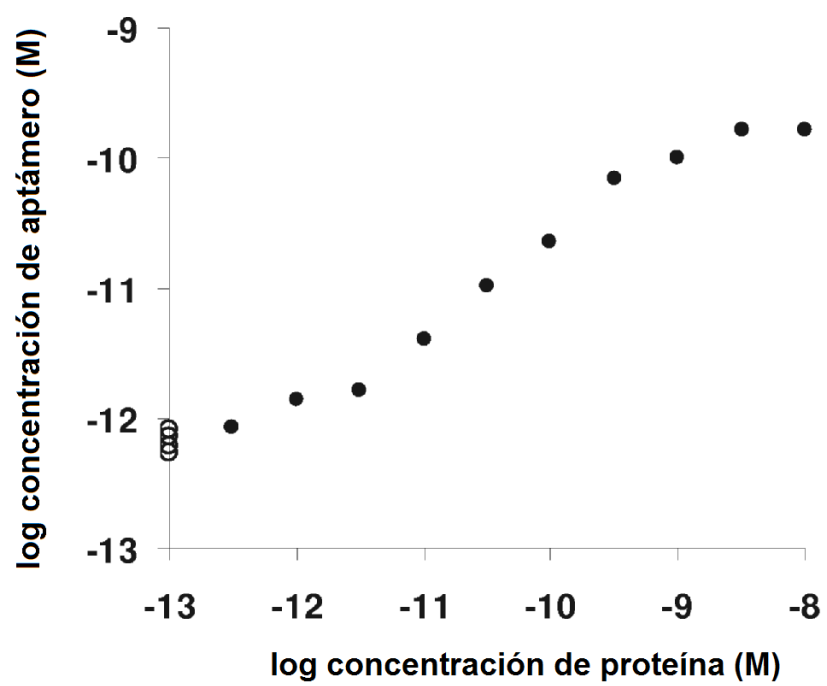


Figura 13A

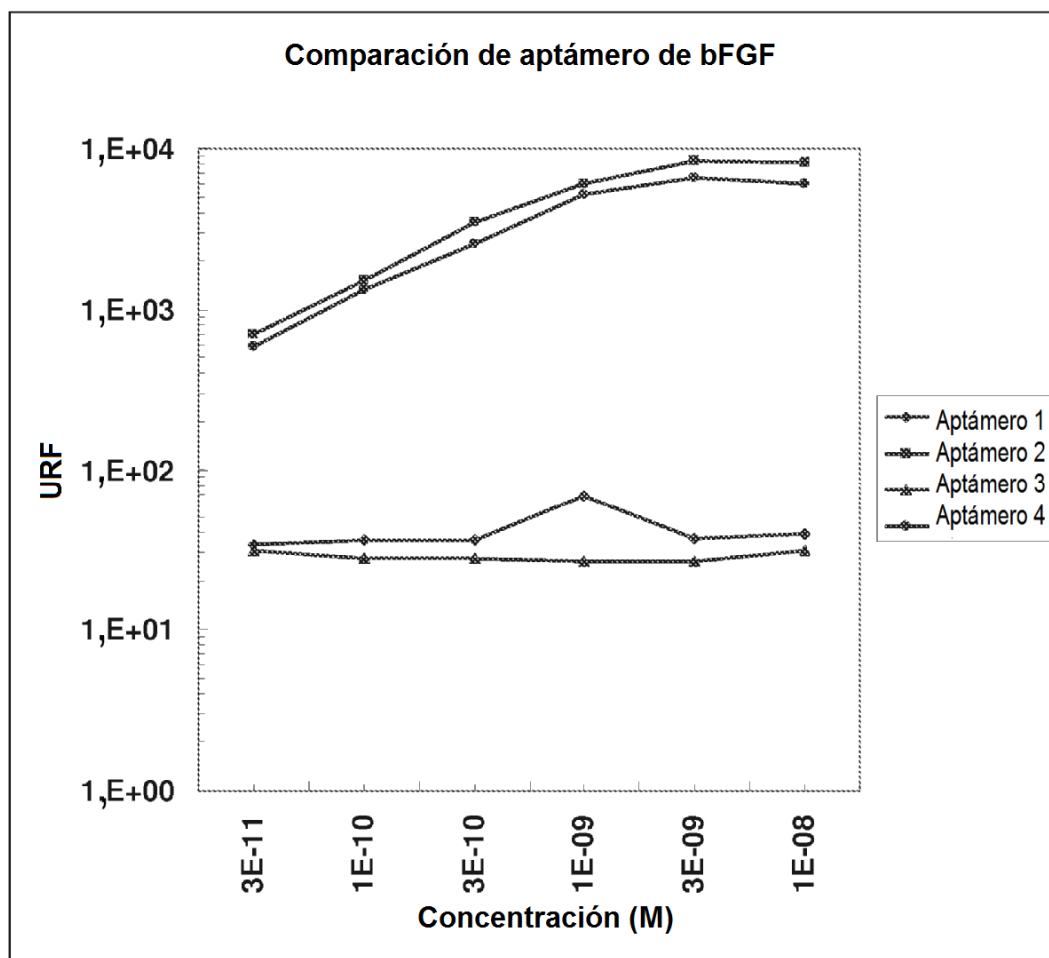


Figura 13B

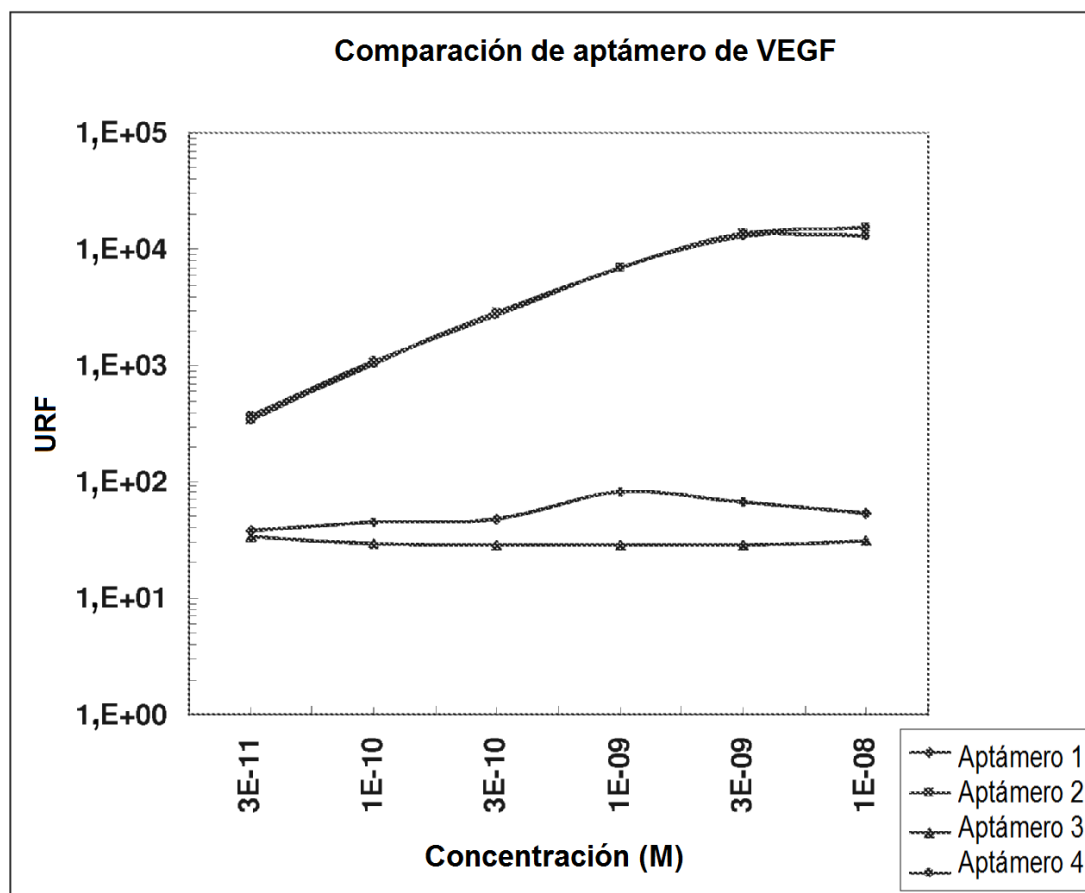


Figura 13C

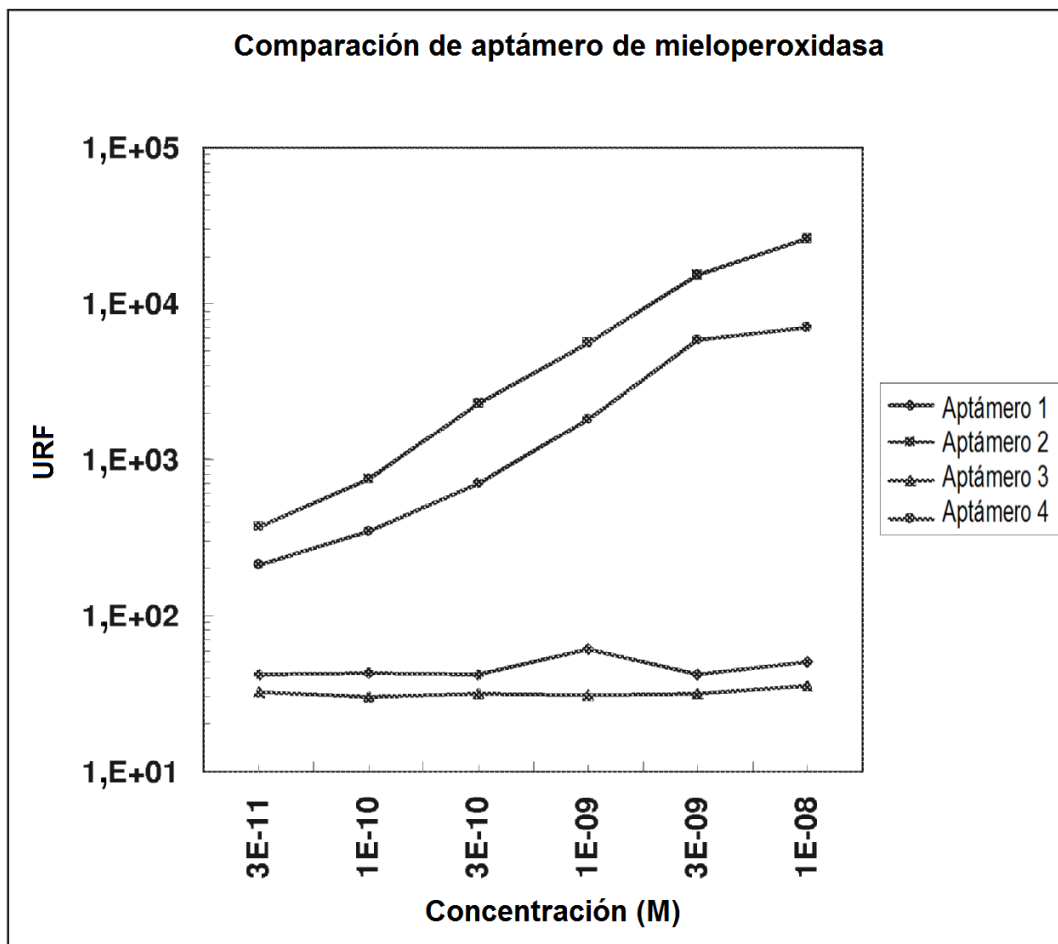


Figura 14

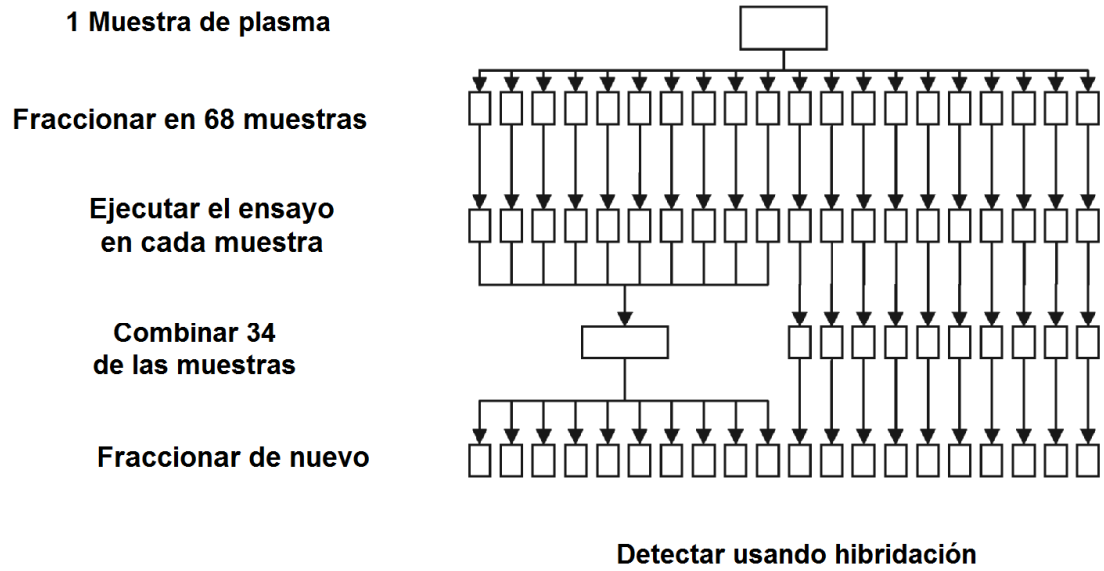


Figura 15

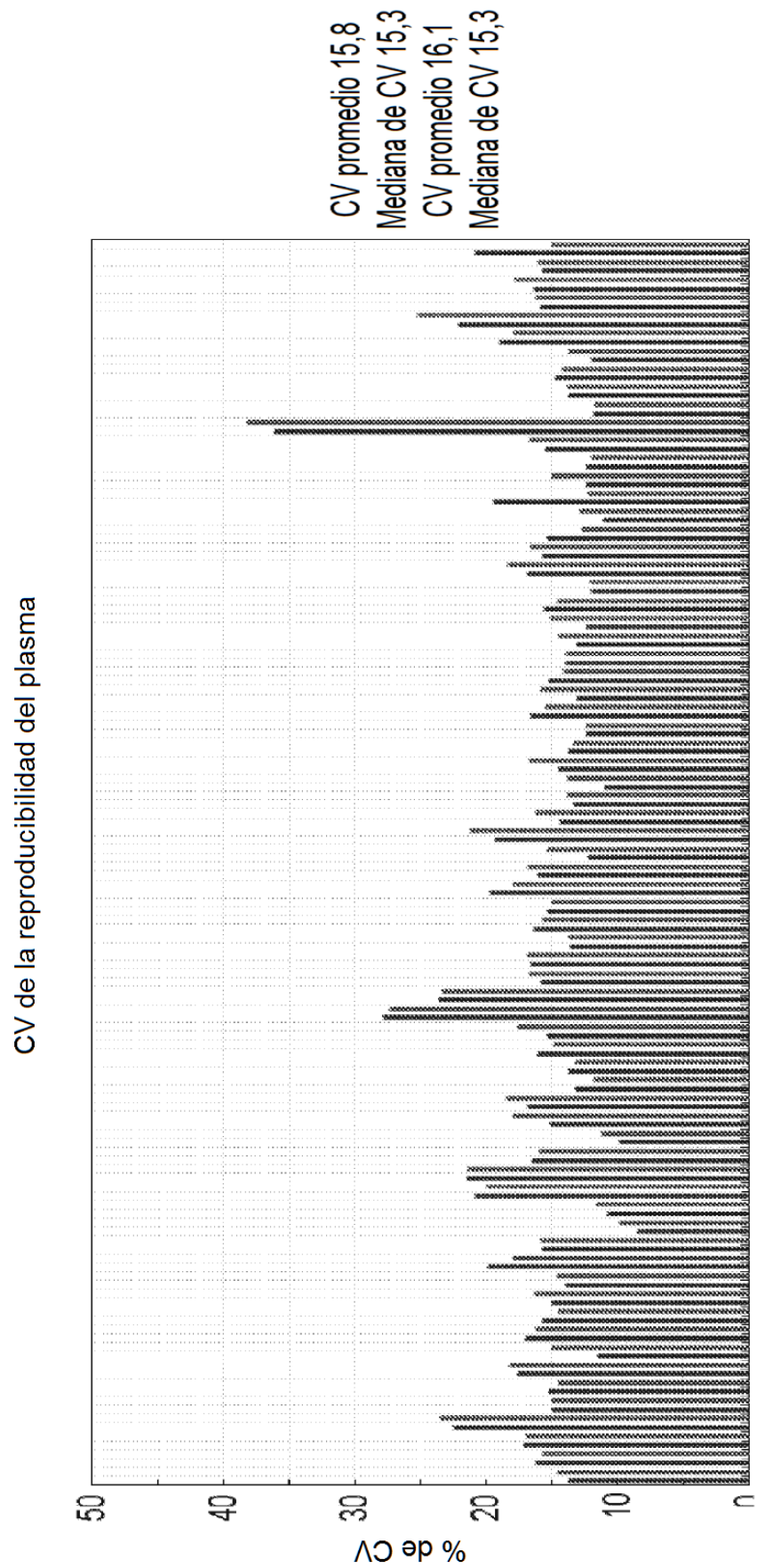
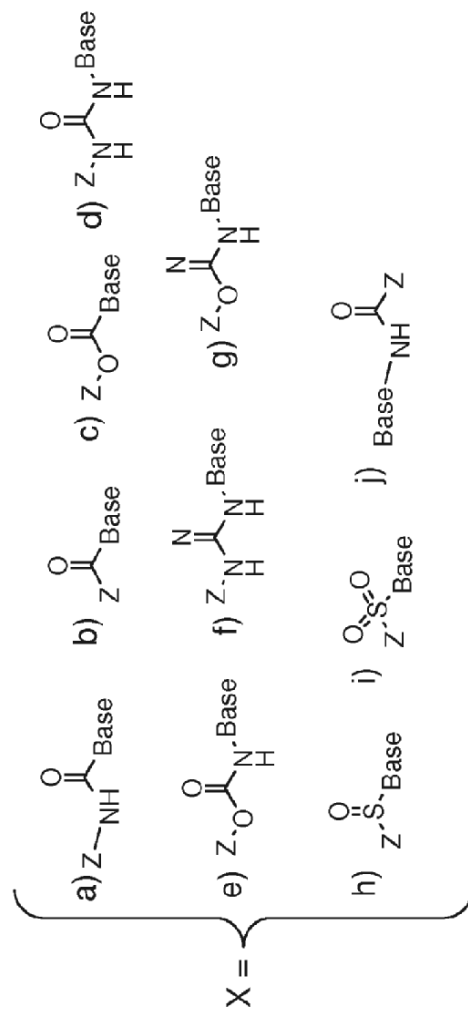


Figura 16



Base = Uridina (U) o citidina (C) (la unión es a la posición 5)
 Z = R más grupo conector $(\text{CH}_2)_n$, en donde $n = 0-3$

Figura 16,
continuación