

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 226**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/US2013/044792**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO2013185078**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13801106 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2859121**

54 Título: **Ensayos multiplexados basados en aptámeros**

30 Prioridad:

07.06.2012 US 201261656956 P

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

15.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SANDERS, GLENN;
KRAEMER, STEPHAN y
KATILIUS, EVALDAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 617 226 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

Ensayos multiplexados basados en aptámeros

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos, dispositivos, reactivos y kits diseñados para mejorar la actuación de ensayos multiplexados basados en aptámeros. Dichos métodos tienen una amplia utilidad en aplicaciones diagnósticas, así como en el descubrimiento de biomarcadores y el diseño y desarrollo de herramientas para la investigación y desarrollo y agentes terapéuticos basados en aptámeros. Específicamente, se proporcionan materiales y métodos para la reducción o eliminación de la señal de fondo.

Antecedentes

15 La siguiente descripción proporciona un resumen de información relevante para la presente divulgación y no una concesión de que cualquier información que se proporciona o publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento es una técnica anterior a la invención reivindicada en el presente.

20 Los ensayos dirigidos a la detección y cuantificación de moléculas fisiológicamente significativas en muestras biológicas y otras muestras son herramientas importantes en la investigación científica y en el campo de la salud pública. Una clase de dichos ensayos implica el uso de una micromatriz que incluye uno o más aptámeros inmovilizados en un soporte sólido. Los aptámeros son capaces de unirse cada uno a una molécula diana de una manera altamente específica y con una afinidad muy alta. Véase por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands", véase también, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 6.242.246, Patente de EE. UU. Nº 6.458.543 y Patente de EE. UU. Nº 6.503.715, cada una de las cuales se titula "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip". Una vez que la micromatriz se pone en contacto con una muestra, los aptámeros se unen a sus moléculas diana respectivas presentes en la muestra y de esta manera se hace posible una determinación de la ausencia, presencia, cantidad, y/o concentración de las moléculas diana en la muestra.

30 Los ensayos multiplexados de aptámeros que proporcionan la interacción dirigida basada en una solución y las etapas de separación diseñadas para retirar componentes específicos de una mezcla de ensayo también se han descrito, véase, Patente de EE. UU. Nº 7.855.054 y 7.964.356 y Publicaciones de EE. UU. Nº US/2011/0136099 y US/2012/0115752. Los métodos de ensayo de aptámeros que se describen utilizan una o más etapas de captura específica para separar los componentes de una muestra de ensayo a partir de la diana o dianas que se van a detectar mientras que se aísla el complejo de afinidad aptámero-diana.

40 La sensibilidad y especificidad de muchos formatos de ensayos están limitadas por la capacidad del método de detección para distinguir una señal verdadera de la señal que se produce debido a asociaciones no específicas durante el ensayo y que da como resultado una señal detectable. Esto es particularmente cierto en los ensayos multiplexados basados en aptámeros. Se había observado que una de las principales fuentes de unión no específica en este tipo de ensayo es una función de la interacción aptámero-aptámero no anticipadas. Como la interacción diana/aptámero depende del mantenimiento de características estructurales del aptámero específico de la diana, cualquier método para reducir las interacciones aptámero-aptámero necesita estar equilibrado de manera que no reduzca las interacciones aptámero/diana específicas. La presente divulgación describe métodos para eliminar la señal de fondo en un ensayo de aptámero multiplexado o sencillo mientras se mantienen las interacciones diana/aptámero específicas.

Sumario

50 La presente divulgación proporciona métodos, dispositivos, reactivos, y kits diseñados para mejorar la actuación de ensayos de analito único y multiplexados basados en aptámeros. Específicamente, se proporcionan materiales y métodos para la reducción o eliminación de la señal de fondo.

55 En una realización, se proporcionan aptámeros que tienen alta afinidad y especificidad por una molécula diana y un primer marcador que se puede liberar. En algunas realizaciones, los aptámeros son fotoaptámeros. En algunas realizaciones este primer marcador que se puede liberar es una biotina fotoescindible. Se describen otros marcadores y restos escindibles y aptámeros que contienen dichos marcadores y restos escindibles.

60 El aptámero que comprende el primer marcador liberable que tiene una afinidad específica por una molécula diana se inmoviliza en un soporte sólido en solución antes de la unión de equilibrio con la muestra de ensayo. La fijación del aptámero al soporte sólido se consigue poniendo en contacto un primer soporte sólido con el aptámero y permitiendo que el primer marcador liberable incluido en el aptámero se asocie o directa, o indirectamente, con un primer agente de captura apropiado que está fijado a o forma parte del primer soporte sólido. Tras la fijación, se lava con una solución tampón a un pH de 11 para retirar los agregados aptámero/aptámero, reduciendo de esta manera la señal de fondo (inmovilización de "Captación 0", definición posterior).

Se prepara entonces una muestra de ensayo y se pone en contacto con los aptámeros inmovilizados que tienen una afinidad específica para sus moléculas diana respectivas. Si la muestra de ensayo contiene la molécula(s) diana, se formará un complejo de afinidad aptámero-diana en la mezcla con la muestra de ensayo. Nótese que además de los complejos de afinidad aptámero-diana, también se unirá el aptámero que no ha formado un complejo al primer soporte sólido. El complejo de afinidad aptámero-diana y el aptámero que no ha formado complejo que se han asociado a la sonda en el soporte sólido se separan del resto de la mezcla, retirando de esta manera la diana libre y todo el resto de material que no ha formado complejos de la muestra de ensayo (matriz de muestra); es decir, los componentes de la mezcla que no se han asociado al primer soporte sólido. Se hace referencia a esta etapa de partición como la partición de Captura-1 (véase la definición posteriormente). Después de la partición del complejo de afinidad aptámero-diana, junto con cualquier aptámero que no ha formado complejos, se libera del primer soporte sólido utilizando un método apropiado para el primer marcador liberable particular que se haya empleado.

En una realización, los complejos de afinidad de aptámero-diana unidos al soporte sólido se tratan con un agente que introduce un segundo marcador al componente de molécula diana de los complejos de afinidad aptámero-diana. En una realización, la diana es una proteína o un péptido, y la diana se biotinila tratándola con NHS-PEO4-biotina. El segundo marcador que se introduce en la molécula diana puede ser el mismo o diferente del marcador de captura del aptámero. Si el segundo marcador es el mismo que el primer marcador, o el marcador de captura del aptámero se pueden bloquear los sitios de captura libres del primer soporte sólido antes de iniciar esta etapa de marcado. Los métodos de marcado, y en particular, el marcado de dianas tales como péptidos y proteínas se describen en la Patente de EE. UU. N° 7.855.054.

La partición se completa liberando los aptámeros que no han formado complejos y los complejos de afinidad aptámero-diana del primer soporte sólido. En una realización, el primer marcador liberable es un resto fotoescindible que se escinde por irradiación con una lámpara UV en condiciones que escinden $\geq 90\%$ del primer marcador liberable. En otras realizaciones, la liberación se consigue por el método apropiado para el resto liberable seleccionado en el primer marcador liberable. Los complejos de afinidad aptámero-diana se pueden eluir y recolectar para su uso adicional en el ensayo o se pueden poner en contacto con otro soporte sólido para llevar a cabo el resto de etapas del ensayo.

En una realización, se lleva a cabo una segunda partición (a la que se hace referencia como partición de Captura-2, véase la definición posteriormente) para retirar el aptámero libre. Como se ha descrito anteriormente, en una realización, se puede añadir un segundo marcador que se utiliza en la partición Captura-2 a la diana mientras que el complejo de afinidad aptámero-diana todavía está en contacto con el soporte sólido utilizado en la captura Captura-0. En otras realizaciones, el segundo marcador se puede añadir a la diana en otro momento del ensayo antes de iniciar la partición Captura-2. La mezcla se pone en contacto con un soporte sólido, teniendo el soporte sólido un elemento de captura (segundo) adherido a su superficie que es capaz de unirse al marcador de captura de la diana (segundo marcador), preferentemente con una alta afinidad y especificidad. En una realización, el soporte sólido son perlas magnéticas (tales como DynaBeads MyOne Streptavidin C1) que están contenidas en un pocillo de una placa de microtitulación y el elemento de captura (segundo elemento de captura) es estreptavidina. Las perlas magnéticas proporcionan un método conveniente para la separación de los componentes separados de la mezcla. Los complejos de afinidad aptámero-diana contenidos en la mezcla se unen de esta manera al soporte sólido por medio de la interacción de unión del marcador de captura de la diana (segundo) y el segundo elemento de captura del segundo soporte sólido. El complejo de afinidad aptámero-diana se separa entonces del resto de la muestra, por ejemplo, lavando el soporte con soluciones tampón, incluyendo tampones que comprenden disolventes orgánicos que incluyen, pero no se limitan a glicerol.

Los aptámeros se eluyen entonces selectivamente de los complejos aptámero-diana con tampones que comprenden sales caotrópicas del grupo que incluyen, pero no se limitan a perclorato sódico, cloruro de litio, cloruro sódico y cloruro magnésico. Los aptámeros retenidos en las perlas de Captura-2 gracias a la interacción aptámero/aptámero no se eluyen por este tratamiento.

En otra realización, el aptámero que se libera de la partición Captura-2 es detectado y es cuantificado adicionalmente por cualquiera de los métodos de detección de ácido nucleico adecuados, tales como, por ejemplo, hibridación en micromatrices de ADN, Q-PCR, espectrometría de masas, ensayo Invader, secuenciación de próxima generación y similares. Estos métodos de detección se describen con mayor detalle posteriormente.

Se puede utilizar cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento para llevar a cabo un ensayo de analito único o un análisis multiplexado de una muestra de ensayo. Cualquier análisis multiplexado puede incluir el uso de dos, decenas, cientos o miles de aptámeros para ensayar simultáneamente un número igual de moléculas diana de una muestra de ensayo, tal como una muestra biológica, por ejemplo. En estas realizaciones, se introduce una pluralidad de aptámeros en la muestra de ensayo y se puede llevar a cabo cualquiera de los ensayos descritos anteriormente. Tras la liberación de los aptámeros, se puede emplear cualquiera de los métodos de detección de ácido nucleico multiplexado adecuados para medir independientemente los diferentes aptámeros que se han liberado. En una realización, esto se puede conseguir por hibridación con sondas complementarias que se han dispuesto por separado en una superficie sólida. En otra realización, cada uno de los diferentes aptámeros se puede detectar basándose en su peso molecular utilizando espectrometría de masas. En otra realización más, cada

uno de los diferentes aptámeros se pueden detectar basándose en la movilidad electroforética, tal como, por ejemplo, en electroforesis capilar, en un gel o por cromatografía líquida. En otra realización, se pueden utilizar sondas PCR únicas para detectar y cuantificar opcionalmente cada uno de los diferentes aptámeros utilizando Q-PCR. En otra realización, se pueden utilizar métodos de secuenciación de próxima generación para detectar y

5 opcionalmente cuantificar cada uno de los diferentes aptámeros.

En cada uno de los ensayos desvelados en el presente documento, se puede utilizar un desafío cinético para aumentar la especificidad del ensayo y para reducir la unión no específica. En una realización, que se puede emplear opcionalmente en cada uno de los ensayos descritos en el presente documento, se puede conseguir una

10 reducción adicional en la unión no específica por pre-incubación con un competidor con la muestra de ensayo o por adición de un competidor a la mezcla durante la unión en equilibrio. En otras realizaciones el desafío cinético se lleva a cabo por dilución.

Otra realización describe un método para detectar una molécula diana que puede estar presente en una muestra de

25 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa gráficamente la retención dependiente de aptámero y la elución posterior de aptámeros de las perlas de Captura-2. El aptámero radiomarcado que no alberga biotina se incubó con perlas magnéticas con estreptavidina que llevaban cantidades crecientes de un aptámero biotinilado no radiomarcado y se lavaron.

30 El material retenido se eluyó entonces con cloruro sódico 1 M en tampón CAPS a pH 10. La cantidad de aptámero radiomarcado eluido es proporcional a la cantidad de aptámero frío adsorbido por las perlas de Captura-2.

Las Figuras 2A-2F ilustran el efecto de la concentración de plasma sanguíneo en el ensayo cuando el aptámero no se pre-inmoviliza antes de equilibrarse con la muestra de ensayo. Con referencia a la Figura 2, el plasma se tituló desde un 0 % v/v a un 25 % v/v. Como se puede ver, la señal de la mayoría de los analitos se estabiliza

35 entre un 10 y un 20 %.

Las Figuras 3A-3F representan gráficamente la recuperación del aptámero en el eluido de fotoescisión en función de la concentración de plasma cuando el aptámero no se pre-inmoviliza antes de equilibrarse con la muestra de ensayo. El eluido de la fotoescisión de Captura-1 se recuperó y se cuantificó por hibridación (eje Y, unidades de fluorescencia relativa). Como se puede ver, la recuperación de aptámero disminuye drásticamente

40 al aumentar la concentración de plasma, cuyos efectos significativos se ven incluso con un 5 % de plasma. Se desconoce si la unión de analito afecta la unión de aptámero a las perlas, sin embargo, se debería señalar que la pérdida preferente de aptámeros que forman complejos generaría efectos dependientes del plasma incluso más grandes.

45 Las Figuras 4A-4D representan gráficamente una comparación de las titulaciones de plasma en ensayos convencionales (curvas negras) y pre-inmovilizados (curvas discontinuas).

Las Figuras 5A-5D representan gráficamente una comparación de la elución con 1 M de NaCl/CAPSO y la elución con 1,8 M de NaClO₄/PIPES utilizando el formato de ensayo pre-inmovilizado descrito en el presente documento. Las curvas convencionales en tampón (curvas inferiores) y con vertido de un 40 % de plasma

50 (curvas superiores) se ejecutaron en un formato de ensayo pre-inmovilizado.

La Figura 6 representa los CV (coeficientes de variación) de 8 pocillos repetidos solo con tampón utilizando la elución con perclorato y aptámeros pre-inmovilizados.

La Figura 7 ilustra el vertido y recuperación medidos para 300 analitos. La recuperación con vertido se define como (señal de analito 10 pM vertido en plasma - señal de analito plasma) /señal de analito 10 pM vertido de tampón).

55 La Figura 8 ilustra el giro a la izquierda de la respuesta a la dosis de tampón en el formato inmovilizado para la proteína ERBB2. Los niveles endógenos medidos son más de diez veces menores y muy cercanos a los niveles endógenos informados.

60 La Figura 9 ilustra una titulación proteica mejorada en tampón, el mejor comportamiento de vertido y recuperación, el comportamiento más lineal de la titulación de plasma y los niveles de proteína endógena previstos más estables para la proteína Activina A.

Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones representativas de la invención. Aunque la invención se describirá en conjunción con las realizaciones enumeradas, se entenderá que la invención no pretende limitarse a estas realizaciones. Por el contrario, se pretende que la invención cubra todas las alternativas, modificaciones, y

equivalentes que se puedan incluir en el alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones.

- La práctica de la presente invención emplea, a menos de que se indique otra cosa, métodos convencionales de química, microbiología, biología molecular, y técnicas de ADN recombinante al nivel del experto en la técnica. Dichas técnicas están totalmente explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Última Edición); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., Última Edición); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames y S. Higgins, eds., Última Edición); *Transcription and Translation* (B. Hames y S. Higgins, eds., Última Edición).
- A menos de que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden utilizar cualquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento para la práctica o ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen ahora.
- Los ejemplos de las publicaciones que se citan y las limitaciones relacionadas con ellas pretenden ser ilustrativos y no exclusivos. Otras limitaciones de las publicaciones que se citan serán evidentes para los expertos en la técnica con la lectura de la memoria descriptiva y un estudio de los dibujos.
- La presente divulgación incluye métodos, dispositivos, reactivos y kits diseñados para mejorar la actuación de los ensayos basados en aptámeros multiplexados. 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 reduciendo o eliminando la señal de fondo.
- Es digno de señalar que, a menos de que se especifique otra cosa 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. Con el fin de ilustración, se describen los métodos con una secuencia específica de etapas; sin embargo, se tiene que entender que es posible cualquier número de permutaciones de la secuencia de etapas especificada siempre que se consiga el objetivo del ensayo particular que se describe. Dicho de otra manera, las etapas enumeradas en cualquiera de los métodos desvelados se pueden llevar a cabo en cualquier orden factible, y los métodos de la invención no se limitan a cualquier orden en particular que se presente en cualquiera de las realizaciones descritas, los ejemplos o las reivindicaciones adjuntas. Además, por conveniencia y facilidad de presentación, se describen los distintos métodos en referencia a una única molécula diana y un único aptámero. Sin embargo, se tiene que entender que cualquiera de los métodos descritos se pueden llevar a cabo en un formato múltiple que puede proporcionar la detección y/o cuantificación de múltiples dianas utilizando múltiples aptámeros, de manera que, por ejemplo, se puedan detectar y/o cuantificar múltiples moléculas diana en una muestra de ensayo poniendo en contacto la muestra de ensayo con múltiples aptámeros, en los que cada aptámero tiene una afinidad específica para una molécula diana particular (es decir, en un formato múltiple).
- Como se utiliza en la presente divulgación, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el” incluyen las referencias plurales, a menos de que el contenido dicte claramente otra cosa, y se utilizan de manera intercambiable con “al menos uno” y “uno o más”. Por lo tanto, la referencia a “un aptámero” incluye mezclas de aptámeros, y similares.
- Como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” representa una modificación o variación insignificante o variación del valor numérico de manera que la función básica del artículo al que se refiere el valor numérico no cambia.
- La expresión “cada uno” cuando se utiliza en el presente documento para referirse a una pluralidad de artículos pretende referirse a al menos dos de los artículos. Necesita que no sea necesario que todos los artículos que forman la pluralidad satisfagan una limitación adicional asociada.
- Como se utiliza 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 excluyente, de manera que un procedimiento, método, producto por el procedimiento, o composición de material que comprende, incluye, o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solamente esos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho procedimiento, método, producto por el procedimiento, o composición de material.
- Como se utiliza en el presente documento, “asociado”, “asocia”, y cualquier variación de los mismos se refiere a una interacción o formación de complejos entre un marcador y una sonda dando como resultado un complejo lo suficientemente estable para permitir una separación de materiales “no asociados” o no unidos, tal como, por ejemplo, componentes no unidos de una muestra de ensayo, a partir del complejo marcador-sonda en condiciones de formación de complejos o reacción determinadas. Un marcador y una sonda se pueden asociar entre ellos directamente interactuando y uniéndose entre ellos con especificidad. Un marcador y una sonda se pueden asociar también entre ellos de manera indirecta tal como cuando su formación de complejo está mediada por una molécula

enlazadora.

Como se utiliza en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o desoxirribonucleótido, o una forma modificada del mismo, así como un análogo del mismo. Los nucleótidos incluyen especies que incluyen purinas (por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análogos) así como pirimidinas (por ejemplo, citosina, uracilo, timina, y sus derivados y análogos).

Como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un polímero de nucleótidos e incluyen ADN, ARN, híbridos ADN/ARN y modificaciones de estos tipos de ácido nucleico, oligonucleótidos y polinucleótidos, en los que se incluye la unión de varias entidades o restos a las unidades de nucleótido en cualquier posición. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" incluye moléculas de cadena doble o sencilla así como moléculas de cadena múltiple (es decir, helicoidales triples). Ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido son términos más amplios que el término aptámero y, por lo tanto, los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido incluyen polímeros de nucleótidos que son aptámeros pero los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido no se limitan a aptámeros.

Como se utiliza en el presente documento, "ligando de ácido nucleico", "aptámero", "SOMAmerno" y "clon" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero no se limita a, unión a la diana, cambio catalítico de la diana, reaccionar con la diana de una manera que modifique o altere la diana o la actividad funcional de la diana, la unión covalente a la diana (como en un inhibidor suicida), y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En una realización, la acción es la unión de afinidad específica de una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido que se une al ligando de ácido nucleico por medio de un mecanismo que es independiente al emparejamiento de bases de Watson/Crick o formación de una triple hélice, en el que el aptámero no es un ácido nucleico que tenga una función fisiológica conocida o que se une a la molécula diana. Los aptámeros contra una determinada molécula incluyen ácidos nucleicos que se identifican de entre una mezcla de ácidos nucleicos candidatos, donde el aptámero es un ligando de la diana, por un método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla de candidatos con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen un aumento de afinidad por la diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla de candidatos se pueden separar del resto de la mezcla de candidatos; (b) separar los ácidos nucleicos con aumento de afinidad a partir del resto de la mezcla de candidatos; y (c) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada para dar lugar a una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, por la que se identifican los aptámeros de la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son un caso de grados; 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 con un grado de afinidad mucho mayor que al que se une a otros componentes no diana de una mezcla o muestra. Un aptámero puede incluir cualquier cantidad de nucleótidos adecuada. "Aptámeros" se refiere a más de uno de dichos grupos de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser de cadena sencilla, cadena doble, o contener regiones de doble cadena o triple cadena. Los aptámeros pueden diseñarse con cualquier combinación de las bases de nucleótidos modificadas que se desee.

Como se utiliza en el presente documento, un "SOMAmerno" o Aptámero modificado de tasa de disociación lenta se refiere a un aptámero (incluyendo un aptámero que comprende al menos un nucleótido con una modificación hidrófoba) con una tasa de disociación ($t_{0.5}$) de ≥ 30 minutos. En algunas realizaciones, los SOMAmernos se generan utilizando los métodos SELEX mejorados descritos en la Patente de EE. UU. N° 7.947.447, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates".

Un aptámero se puede identificar utilizando cualquier método conocido incluyendo el procedimiento SELEX. Véase, por ejemplo, La Patente de EE. UU. N° 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands". Una vez identificado, un aptámero se puede preparar o sintetizar de acuerdo con cualquier método conocido, incluyendo métodos sintéticos químicos y métodos sintéticos enzimáticos.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "complejo de afinidad aptámero-diana", "complejo de afinidad de aptámero" o "complejo de aptámero" se refiere a un complejo no covalente que está formado por la interacción de un aptámero con su molécula diana. "Complejos de afinidad aptámero-diana", "complejos de afinidad de aptámero" o "complejos aptámero" se refiere a más de uno de dichos grupos de complejos. Un complejo de afinidad aptámero-diana, complejo de afinidad de aptámero o complejo de aptámero pueden revertirse o disociarse en general por un cambio en las condiciones ambientales, por ejemplo, un aumento de la temperatura, un aumento en la concentración salina, o la adición de un desnaturalizante.

En algunas realizaciones, se proporciona un complejo no covalente de un aptámero y su diana, en el que el aptámero tiene una K_d para la diana de aproximadamente 100 nM o menos, en el que la tasa de disociación (según se determina por la semivida del complejo; $t_{1/2}$) del aptámero de la diana es mayor o igual a aproximadamente 30 minutos; y/o en el que una, varias o todas las pirimidinas de la secuencia de ácido nucleico del aptámero están modificadas en la posición 4 de la base.

Como se utiliza en el presente documento, "complejo no específico" se refiere a una asociación no covalente entre dos o más moléculas distintas de aptámero y su molécula diana. Debido a que el complejo no específico no se selecciona basándose en una interacción de afinidad entre sus moléculas constituyentes, si no que representa una interacción entre clases de moléculas, las moléculas asociadas en un complejo no específico presentarán, en promedio, afinidades mucho menores entre ellas y tendrán consecuentemente una mayor tasa de disociación que un aptámero y su molécula diana. Los complejos no específicos incluyen complejos formados entre un aptámero y una molécula no diana, un aptámero y otro aptámero, un competidor y una molécula no diana, un competidor y una molécula diana, un aptámero y un competidor, y una molécula diana y una molécula no diana, así como agregados de mayor orden de aptámero, molécula diana, molécula no diana, superficie y competidor.

Como se utiliza en el presente documento, "molécula diana", "analito", y "diana" se utilizan de manera intercambiable para referirse a cualquier molécula de interés a la que se puede unir un aptámero con alta afinidad y especificidad y que puede estar presente en la 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 de la secuencia de aminoácidos, formación de puentes disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente marcador que no altere sustancialmente la identidad de la molécula. Moléculas diana a modo de ejemplo incluyen proteínas, oligopéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, polisacáridos, glucoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, aficuerpos, miméticos de anticuerpos, virus, agentes patógenos, sustancias tóxicas, sustratos, metabolitos, análogos de estados de transición, inhibidores, fármacos, colorantes, nutrientes, factores de crecimiento, células, tejidos, y cualquier fragmento o parte de cualquiera de los anteriores. Un aptámero se puede identificar virtualmente por cualquier molécula química o biológica de cualquier tamaño, y por lo tanto virtualmente cualquier molécula química o biológica de cualquier tamaño puede ser una diana adecuada. Una diana también se puede modificar para aumentar la probabilidad o la fuerza de interacción entre la diana y el aptámero. Una diana se puede modificar también para incluir un marcador, como se ha definido anteriormente. En realizaciones a modo de ejemplo, la molécula diana es una proteína. Véase la Patente de EE. UU. N° 6.376.190 titulada "Modified SELEX Processes Without Purified Protein" para los métodos en los que la diana SELEX es un péptido.

"Polipéptido", "péptido", y "proteína" se utilizan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos engloban también un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, por formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También se incluyen en la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ser de cadena sencilla o con cadenas asociadas.

La expresión "muestra de ensayo" se refiere en el presente documento a cualquier material, solución, o mezcla que contiene una pluralidad de moléculas y puede incluir al menos una molécula diana. La expresión muestra de ensayo incluye muestras biológicas, como se define posteriormente, y muestras que se pueden utilizar para ensayos ambientales o toxicológicos, tales como agua contaminada o potencialmente contaminada y vertidos industriales, por ejemplo. Una muestra de ensayo también puede ser un producto final, un producto intermedio, o un subproducto de un procedimiento preparatorio, por ejemplo un procedimiento de fabricación. Una muestra de ensayo puede incluir cualquier medio de ensayo adecuado, tampón, o diluyente que se ha añadido a un material, solución, o mezcla que se obtiene de un organismo o de cualquier otra fuente (por ejemplo, el medio ambiente o una fuente industrial).

La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material, solución, o mezcla obtenida de un organismo. Esto incluye la sangre (incluyendo sangre completa, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, y suero), esputo, exhalación, orina, semen, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido glandular, líquido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, células, extracto celular y líquido cefalorraquídeo. También se incluyen fracciones separadas experimentalmente de todos los precedentes. La expresión "muestra biológica" también incluye materiales, soluciones, o mezclas que contienen material sólido homogeneizado, tal como de una muestra de heces, una muestra tisular, o una biopsia de tejido, por ejemplo. La expresión "muestra biológica", incluye también materiales, soluciones, o mezclas derivados de una línea celular, cultivo tisular, cultivo celular, cultivo bacteriano, cultivo vírico o sistema biológico celular libre (por ejemplo, IVTT).

En cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, se puede comparar una muestra de ensayo con una muestra de referencia. Una "muestra de referencia" se refiere en el presente documento a cualquier material, solución, o mezcla que contiene una pluralidad de molécula y que se sabe que incluye al menos una molécula diana. La cantidad precisa o concentración de cualquiera de las moléculas diana presentes en la muestra de referencia también puede ser conocida. La expresión muestra de referencia incluye muestras biológicas, como se han definido en el presente documento, y muestras que se pueden utilizar para ensayos medioambientales o toxicológicos, tal como agua contaminada o potencialmente contaminada y vertidos industriales, por ejemplo. Una muestra de referencia también puede ser un producto final, un producto intermedio, o un subproducto de un proceso preparatorio, por ejemplo un procedimiento de fabricación. Una muestra de referencia puede incluir cualquier medio

de ensayo adecuado, tampón, o diluyente que se ha añadido a un material, solución, o mezcla obtenida de un organismo o de cualquier otra fuente (por ejemplo, el medioambiente o una fuente industrial).

5 Como se utiliza en el presente documento, "molécula no diana" y "no diana" se utilizan de manera intercambiable para hacer referencia a una molécula contenida en una muestra de ensayo y que puede formar un complejo no específico con un aptámero. Se apreciará que una molécula que es una no diana para un primer aptámero puede ser una diana para un segundo aptámero. De igual manera, una molécula que es una diana para un primer aptámero puede ser una no diana para el segundo aptámero.

10 Como se utiliza en el presente documento "partición" se refiere a una separación, concentración o eliminación de una o más especies moleculares de la muestra de ensayo u otras moléculas de la muestra de ensayo. La partición se puede utilizar para aumentar la sensibilidad y/o reducir la señal de fondo. La partición es más eficaz después de la formación del complejo de aptámero o cuando, el complejo de afinidad aptámero-diana se vuelve irreversible debido al enlace covalente introducido durante el entrecruzamiento. Se puede introducir una etapa de partición tras cualquier etapa, o tras cada etapa, cuando el complejo de afinidad aptámero-diana está inmovilizado. La partición puede basarse también en la diferenciación de tamaño u otra propiedad específica que existe diferencialmente entre el complejo de afinidad aptámero-diana y otros componentes de la muestra de ensayo. La partición también se puede conseguir por medio de una interacción específica con un aptámero o diana. La partición puede conseguirse también basándose en las propiedades físicas o bioquímicas del aptámero, diana, complejo de afinidad aptámero-diana o complejo covalente aptámero-diana.

25 En los ensayos de analito único y de aptámeros multiplexados, se han diseñado varias etapas para separar los complejos de afinidad específicos de aptámeros de los materiales de la muestra o los reactivos del ensayo que pueden dar lugar a señales de fondo confusas. A pesar de implementar estas etapas, la señal de fondo sigue siendo un problema en este tipo de ensayos. La señal de fondo en un método analítico se puede afrontar empíricamente o una estrategia mejor es identificar la fuente de la señal de fondo y eliminar la interacción que da lugar al fondo. Se ha descubierto que la interacción aptámero-aptámero es una fuente de fondo en los métodos de aptámero multiplexado. Los reactivos que reducen las interacciones ADN-ADN y ARN-ARN, incluyendo los que se basan en la secuencia son conocidos. Debido a que las interacciones internas de un aptámero determinan la estructura secundaria y terciaria del aptámero, no se espera que estos tipos de reactivos reduzcan sustancialmente la señal de fondo en un ensayo multiplexado sin afectar el plegamiento del aptámero y por lo tanto, la unión a sus dianas correspondientes. Se describen materiales y métodos que equilibran la necesidad de reducir la señal de fondo con el mantenimiento de la estructura del aptámero.

35 La presente divulgación describe métodos mejorados para llevar a cabo los ensayos multiplexados basados en aptámeros y fotoaptámeros para la cuantificación de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra de ensayo en la que se puede separar el aptámero (o fotoaptámero) del complejo de afinidad aptámero-diana (o complejo covalente fotoaptámero-diana) para la detección final utilizando cualquier método de detección de ácidos nucleicos adecuado en tanto en cuanto se pueden utilizar los materiales y métodos descritos en el presente documento para mejorar la actuación total del ensayo. Los fotoaptámeros y aptámeros comprenden grupos funcionales fotorreactivos que hacen posible que los aptámeros se unan covalentemente o se "fotoentrecruzan" con sus moléculas diana.

45 Aparecieron dos limitaciones no previstas al examinar detalladamente los métodos descritos anteriormente para llevar a cabo los ensayos basados en aptámeros sencillos o múltiples, incluyendo los ensayos de afinidad de aptámeros proteómicos multiplexados. En primer lugar, se identificaron las interacciones aptámero/aptámero como la fuente primaria de fondo del ensayo y de limitación potencial para la capacidad múltiple. En segundo lugar, se descubrió que las matrices de muestras (primariamente suero y plasma) inhibían la inmovilización de aptámeros biotinilados en matrices sustituidas con estreptavidina. Se describen en el presente documento tres innovaciones primarias que reducen y/o eliminan ambas limitaciones del procedimiento. Dos son únicas de un método mejorado descrito en el presente documento (a las que se hace referencia en el presente documento como "Versión 3" del ensayo multiplexado); la otra se implementó en una versión anterior del ensayo como se describe en Gold et al. (Dic. 2010) "Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery," PLoS One 5(12):e15005). La Versión 3 es una realización de la invención descrita en el presente documento.

55 La primera mejora en el ensayo, como se describe en Gold et al. (PLoS One (2010) 5(12):e15005), comprende el uso de disolventes orgánicos en algunos de los tampones de lavado de la etapa de Captura-2 para disminuir la constante dieléctrica del medio. La adición de estos tampones de lavado acentúa eficazmente la repulsión tipo carga de matrices fosfodiéster adyacentes de los aptámeros, promoviendo de esta manera la disociación de los aptámeros que interactúan produciendo la señal de fondo.

65 La segunda mejora del procedimiento que se describe en el presente documento proporciona una ventaja doble. En primer lugar, como en el caso de la adición de disolventes orgánicos a algunos de los tampones de lavado utilizados en la etapa de Captura-2 del ensayo, también se tiene en cuenta la tendencia de los aptámeros para interactuar, y por lo tanto se disminuye la señal de fondo y se aumenta la capacidad múltiple. Sin embargo, su ventaja primaria es contrarrestar la inhibición dependiente de matriz de la absorción del aptámero biotinilado por las matrices de

estreptavidina. Dicha inhibición es detectado fácilmente incluso a un 5 % v/v de plasma o suero, y limita las concentraciones de trabajo del ensayo a concentraciones de un 5-10 % de plasma o suero. Esta limitación limita a su vez la sensibilidad del ensayo.

- 5 La segunda mejora para el ensayo multiplexado, como se describe en el presente documento comprende la pre-inmovilización de los aptámeros marcados en matrices de soporte sólido antes de equilibrarse (denominado "Captura-0) con la solución de ensayo. El equilibrado con la solución de ensayo se lleva entonces a cabo con aptámeros unidos, en los mismos matraces del procedimiento. Como se describe en el presente documento con fines solo de ilustración, los aptámeros biotinilados se pre-inmovilizaron en matrices de perlas con estreptavidina, y se llevó a cabo el equilibrado con la solución de ensayo con los aptámeros unidos a las perlas. Esta etapa de inmovilización permite la inmovilización en condiciones en las que los aptámeros tienen una disminución de la tendencia a interactuar y también permite lavados muy rigurosos (con bases y con sales caotrópicas) antes del equilibrado, alterando los aptámeros que interactúan y eliminando todos los aptámeros no unidos gracias a la interacción muy robusta de la biotina-estreptavidina. Esto reduce la cantidad de "grumos" de aptámero atravesando el ensayo – grumos que con cierta frecuencia retenían el resto de biotina detectable o se convertían en biotinilados en el ensayo. Hay que señalar que la radiación escinde la mayoría, pero no todos los restos de biotina fotoescindible de los aptámeros, mientras que algunos aptámeros se convierten en biotinilados por medio de un tratamiento de biotina-NHS que pretende "marcar" proteínas. El aptámero biotinilado que se captura en la etapa Captura-2 crea una señal de fondo interactuando con el volumen de aptámeros fotoescindidos, que se liberan entonces con la elución (Figura 1). También se debería señalar que un formato pre-inmovilizado soportará probablemente capacidades múltiples muy altas ya que se pueden inmovilizar paneles de aptámeros por separado y luego combinarse en forma de unión en perlas, rodeando de esta maneja las condiciones en las que los aptámeros puedan interactuar y aglomerarse.
- 10
- 15
- 20
- 25 Por lo tanto, la pre-inmovilización rodea la necesidad de la adsorción del aptámero en presencia de la solución de analito, asegurando de esta manera la inmovilización cuantitativa incluso cuando hay concentraciones inhibitoras del ensayo de soluciones de analito. Esto hace posible el uso de concentraciones mucho mayores, de hasta, e incluyendo al menos un 40 % v/v de plasma o suero, más que la concentración máxima del 10 % del procedimiento que se había descrito anteriormente. (Gold et al. (PLoS One (Dic. 2010) 5(12):e15005) o la concentración máxima del 5 % utilizando en las ediciones más recientes del procedimiento aumentando de esta manera la sensibilidad aproximadamente 4 a 8 veces, así como aumentando, la robustez total del ensayo.
- 30

La tercera mejora del procedimiento total, como se describe en el presente documento comprende el uso de una sal caotrópica a pH neutro para la elución durante la etapa Captura-2 como se describe detalladamente posteriormente. Los métodos anteriores comprendían el uso de cloruro sódico a pH alto (10), que alteraba la hibridación de ADN y la interacción aptámero/aptámero así como la interacción proteína/aptámero. Como se ha señalado anteriormente, la hibridación de ADN y la interacción aptámero/aptámero contribuyen a la señal de fondo del ensayo. Las sales caotrópicas, que incluyen, pero no se limitan a perclorato sódico, cloruro de litio, cloruro sódico y cloruro magnésico a pH neutro, soportan la hibridación de ADN y las interacciones aptámero/aptámero, aunque alteran las interacciones aptámero/proteína. El resultado neto disminuye significativamente (aproximadamente 10 veces) la señal de fondo, con un aumento concomitante de la sensibilidad del ensayo.

35

40

Revisión de los ensayos de aptámero múltiples descritos anteriormente

- 45 Los aptámeros se equilibraron con una muestra de ensayo (por ejemplo, plasma) en solución. Los complejos entre analitos y aptámeros de larga duración (semivida media cercana a 30 minutos), particularmente los aptámeros de tasa de disociación lenta se formaban en este periodo. La mezcla de equilibrado, que comprendía la matriz de muestra, el aptámero, los analitos proteicos y los complejos aptámero/ analito se exponían entonces a estreptavidina inmovilizada en perlas de agarosa (SA-agarosa) (en el caso en el que el aptámero estaba marcado con un resto de biotina). Los aptámeros de la mezcla se capturaban en las SA-agarosa por medio del resto de biotina adjunto. Nótese que el ensayo es dependiente de la captura cuantitativa de aptámero en esta etapa. Los aptámeros inmovilizados se lavaban entonces en condiciones suaves, que eliminaba la proteína libre y unida débilmente, pero dejaba los aptámeros y los complejos aptámero/analito detrás. Esta etapa, denominada "Captura-1", puede pensarse que es una etapa de purificación proteica (Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 7.947.447 y 7.855.054).
- 50
- 55

Las perlas de agarosa, que albergan los aptámeros y los complejos analito/aptámero, se trataban entonces con biotina-NHS, dejando un "marcador" biotina en los analitos proteicos unidos a aptámeros. Tras un lavado adicional, los aptámeros, incluyendo los complejos analito biotinilado/aptámero se liberaban de las perlas de agarosa por medio de la escisión de un enlazador lábil entre el aptámero y el resto de biotina (como se describe en el ejemplo posterior, con fines solo de ilustración, se utiliza un enlazador fotolábil que se escinde al exponerlo a luz UV). El denominado eluido fotoescindido se transfiere entonces a un pocillo que contiene perlas de estreptavidina magnéticas. Los complejos de aptámero/analito biotinilado se adsorben preferentemente. Se hace referencia a esta etapa de captura como "Captura-2". (Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 7.947.447 y 7.855). Después de los lavados, los aptámeros que están unidos ahora a las perlas por medio de los analitos se eluyeron con una solución de cloruro sódico a pH elevado. Los aptámeros recuperados es cuantificaron entonces por hibridación

60

65

con micromatrices comerciales. Las cantidades recuperadas de aptámero sirven como un equivalente de la concentración de proteína, que se determina formalmente por medio de una curva de referencia.

5 Como se ha señalado anteriormente, se había observado que las cantidades sustanciales de aptámero que atraviesan el ensayo (es decir que pasan a través de las etapas de partición) y crean la señal de fondo incluso en ausencia de proteína añadida de una muestra de ensayo. La fuente de esta señal de fondo independiente de la proteína se trazó respecto a la interacción aptámero/aptámero, como se ilustra en la Figura 1. Se exploraron varias estrategias de mitigación para afrontar este problema, que se describen en Gold et al. (PLoS One (2010) 5(12):e15005). En último término, se seleccionaron lavados en glicerol caliente como una estrategia eficaz y adecuada para mitigar este problema. Sin embargo, distintos disolventes y reactivos que reducen la constante dieléctrica del agua son capaces de mitigar la señal de fondo del ensayo de manera similar. Ejemplos incluyen, por no se limitan a glicerol, propilenglicol, trealosa, etanol y similares.

15 **Mitigación de la inhibición de captura por la pre-absorción de aptámeros**

Como se ha señalado anteriormente, se determinó que el suero y el plasma disminuyen la eficacia de captura de aptámeros, limitando la concentración que se puede medir y se ilustra en las Figuras 2 y 3.

20 Como se ilustra en la Figura 4, la pre-inmovilización de los aptámeros y el equilibrado posterior, como se describe en el presente documento, mitiga el problema de inhibición de captura y hace posible el uso de concentraciones de plasma mucho más altas. Específicamente, se pueden utilizar concentraciones de hasta, y que incluyen al menos un 40 % v/v de plasma o suero, en vez de la concentración máxima del 10 % del procedimiento descrito anteriormente en Gold et al. (PLoS One (Dic. 2010) 5(12):e15005), o la concentración máxima del 5 % en las ediciones más recientes, de manera que aumenta la sensibilidad aproximadamente 4 a 8 veces, así como, aumenta la robustez total del ensayo.

25 En referencia a la Figura 4, se puede ver que se puede observar un aumento lineal en la señal todo el tiempo hasta el 40 % v/v de plasma (compárese la línea marcada con (g), formato pre-inmovilizado, con la línea marcada con (s), formato convencional). Nótese que una señal observada con un Espuriómero (un equivalente para la señal de fondo dependiente de proteína, en los dos paneles inferiores) se considera mayor en el formato convencional, sugiriendo que la pre-inmovilización puede reducir la señal de fondo dependiente de proteína.

35 **Reducción de la señal de fondo del ensayo y aumento de la sensibilidad del ensayo utilizando una sal caotrópica para la elución**

Como se ilustra en la Figura 5, el uso de una sal caotrópica para la elución disminuye la señal de fondo y aumenta la sensibilidad del ensayo. En referencia a la Figura 5, se puede ver que la señal de fondo del ensayo en el tampón se reduce significativamente con la elución en perclorato (compárese la curva inferior de la Figura 5A con la curva inferior de la Figura 5B). La señal de fondo del ensayo cayó hasta 20-40 RFU. Los niveles endógenos aparentes se reducen también de alguna manera para la IL-11 con la elución en perclorato, indicando la disminución de la señal de fondo dependiente de proteína (aproximadamente 0,2 pM frente a 1 pM).

45 La siguiente Tabla resume los resultados (RFU) de la comparación de la elución con CAPSO/NaCl y perclorato. Se muestran la mediana y la media de las señales para todos los SOMAmeros de cada grupo de dilución (columna 2) en presencia de plasma (5 % v/v de plasma para un 5 % de SOMAmeros; 0,316 % v/v de plasma para 0,316 % de SOMAmeros, y 0,01 % de plasma para 0,01 % de SOMAmeros) en las filas 1-6; las medianas y medias de las señales para todos los SOMAmeros llamados Espuriómeros (SOMAmeros diseñados en silicio que no tienen un analito equivalente) en presencia de un 5 % de plasma se muestran en las filas 8 y 9; y las señales medianas y medias de todos los SOMAmeros en todas las soluciones en presencia solo de tampón se muestran en la fila 10.

50 **Tabla 1**

	dilución	CAPSO	NaClO₄
Mediana	5 %	850	400
Media	5 %	6500	6200
Mediana	0,316 %	8500	7300
Media	0,316 %	20000	22000
Mediana	0,01 %	27000	22000
Media	0,01 %	62000	63000

Mediana	Espuriómero	280	85
Media	Espuriómero	350	150
Mediana	Tampón	75	20
Media	Tampón	95	28

Los resultados representados en la Figura 5 se reflejan en los resultados mostrados en la tabla. La elución con perclorato genera comparativamente señales más bajas en el tampón, señales de espuriómero significativamente reducidas en el plasma, y señales marginalmente reducidas en las mezclas del 0,01 % y 0,316 % donde las señales se originan sin ambigüedad de analitos equivalentes.

Los coeficientes de variación (CV) en las señales del tampón de la elución con perclorato se midieron en 8 repeticiones, razonando que las señales cercanas a la señal de fondo de la máquina se titulaban como ruidosas y por lo tanto se podía excluir de la realización de los límites inferiores muy bajos (LLOQ) sugeridos por estas señales de fondo muy bajas. En este experimento, con una señal mediana de solo 32 RFU, el CV mediano bruto era del 6,2 % (Figura 6). La estabilidad de estas señales muy bajas probablemente no era un factor que limitara los LLOQ.

Comparación de la realización del ensayo

Se hizo una comparación formal entre la versión más reciente del método desvelado en Gold et al. (PLoS One (Dic. 2010) 5(12):e15005) (denominada “Ensayo Previo” en la Tabla 2) y la presente divulgación (Versión 3 en la Tabla 2). El alto grado de similitud entre los protocolos permitía un ensayo en el que se podían ejecutar ambos protocolos de ensayo en una única ejecución robótica, de hecho sobre las mismas placas de filtro, con una intervención manual mínima. El ensayo incluía 8 muestras de plasma repetidas, para determinar la variabilidad, 8 pocillos de respuesta a la dosis de tampón, y 8 pocillos con vertido de plasma. Nótese que la Versión 3 utilizaba concentraciones de plasma mucho más grandes que una versión del ensayo anterior que se hacía con el ensayo previo (40, 1,3 y 0,044 % en oposición a 5, 0,167, y 0,0056 %). Un resumen de los resultados en el espacio RFU y RFU normalizadas a la concentración se muestran a continuación (Tabla 2).

Tabla 2

	Ensayo previo	Versión 3	Cambio (veces)
Espuriómero y señal no humana (rfu)	756 (18, 120) 5 % plasma	202 (505) 40 % de plasma	Menos de 3,7 veces (menos de 30 veces)
Alta abundancia (rfu) (rfu normalizada)	42,313 (7,61 x 10 ⁸) 0,0056 % de plasma	50.741 (1,14 x 10 ⁸) 0,044 % de plasma	Hasta 1,2 veces (Menos de ~ 7 veces)
Abundancia media (rfu) (rfu normalizada)	22.375 (1,3 X 10 ⁷)	22.812 (1,7 X 10 ⁶) 1,3 % de plasma	Aproximadamente igual (menos de ~ 7 veces)
Abundancia baja (rfu) (rfu normalizada)	1540 (30,800)	931 (2.327) 40 % de plasma	Menos de 1,7 veces (menos de 13 veces)
Solo tampón (todos)	252	27	Por debajo de 9,3 veces

En referencia a la Tabla 2, se puede ver que las señales de fondo brutas disminuyen en la Versión 3 aproximadamente 4 veces según se determina por las señales del Espuriómero y los aptámeros para dianas no humanas, mientras que las señales de analito brutas son aproximadamente las mismas, según se mide por las señales de los analitos con abundancia media y alta. Nótese que estos valores se obtuvieron con un 40 % de plasma en la Versión 3, mientras que se utilizó un 5 % de plasma en una versión anterior del ensayo. Si se normalizan las señales a un 100 % de plasma (valores entre paréntesis), las señales de fondo caen significativamente (aproximadamente 30 veces) mientras que las señales con analito están por debajo de aproximadamente 7 veces. Las señales solo con tampón caen cerca de un log. Nótese que la reducción en la señal de fondo tiene un coste –se necesitaban aproximadamente 15 µl de plasma en el ensayo previo, mientras que se necesitan aproximadamente 60 µl para la Versión 3. Este consumo elevado de muestra tiene poca importancia probablemente para las muestras de animales grandes (por ejemplo, el ser humano), pero puede ser un factor para el análisis de muestras longitudinales para pequeños animales tales como los ratones. Las recuperaciones totales de vertido eran mucho mayores para la realización de la presente invención que se demuestra en la Versión 3, que para la versión del ensayo anterior, con medianas siendo del 80 % frente a justo el 25 % para la versión del ensayo anterior, como se ilustra en la Figura 7. La mayoría de esta mejoría se puede atribuir a la inmovilización de los aptámeros antes del equilibrio.

Las Figuras 8 y 9 representan dos ejemplos de una comparación directa de las curvas de titulación proteica en el tampón (paneles de la izquierda, curva inferior), las proteínas vertidas en el plasma (paneles de la izquierda, curva superior), titulación de plasma (paneles medios) y niveles endógenos calculados (mapeado de la titulación de

plasma en las curvas de proteína de referencia, paneles de la derecha) para el ensayo previo (paneles superiores) y el método descrito en el presente documento (paneles inferiores). Nótese que la proteína vertida en un 5 % de plasma para el ensayo previo y un 40 % de plasma para el método descrito en el presente documento. Una curva de comparación típica muestra la respuesta a la dosis del tampón, vertido de plasma, y niveles endógenos medidos que se pueden ver en la Figura 8. Un ejemplo claro de recuperación del vertido mejorado se puede ver en la Figura 9.

Ensayo de aptámeros multiplexados mejorado

En una realización, se proporcionan aptámeros que tienen alta afinidad y especificidad por una molécula diana y un primer marcador liberable. En algunas realizaciones los aptámeros son fotoaptámeros. En otra realización, se añade el primer marcador liberable en cualquier momento del ensayo antes de la partición de Captura-1 (como se define posteriormente en el párrafo [0082]). En una realización, este primer marcador liberable es una biotina fotoescindible. Se describen otros marcadores y restos escindibles y aptámeros que contiene dichos marcadores y restos escindibles.

El aptámero que comprende el primer marcador liberable que tiene una afinidad específica por una molécula diana se inmoviliza en un soporte sólido en solución antes del equilibrado con la muestra de ensayo. La fijación del aptámero al soporte sólido se consigue poniendo en contacto un primer soporte sólido con el aptámero y permitiendo que el primer marcador liberable incluido en el aptámero se asocia bien directa o indirectamente, con un primer agente de captura apropiado que está unidos al primer soporte sólido. Los lavados con una solución tampón a un pH 11 retira los agregados aptámero/soporte sólido, reduciendo de esta manera la señal de fondo del ensayo. Estas etapas comprenden la "Captura-0".

Una muestra de ensayo se prepara entonces (como se describe en el Ejemplo) y se pone en contacto con los aptámeros inmovilizados que tienen una afinidad específica por sus respectivas moléculas diana. Si la muestra de ensayo contiene la molécula(s) diana, se formará un complejo de afinidad aptámero-diana en la mezcla con la muestra de ensayo. Nótese que además de los complejos de afinidad aptámero-diana, también se unirán aptámeros que no forman complejos en el primer soporte sólido. El complejo de afinidad aptámero-diana y el aptámero que no forma complejos que está asociado al soporte sólido se separa entonces del resto de la mezcla, retirando de esta manera la diana libre y todo el otro material que no forma complejos de la muestra de ensayo (matriz de muestra); es decir, los componentes de la mezcla que no se asocian con el primer soporte sólido. Después de la partición, el complejo de afinidad aptámero-diana, junto con cualquier aptámero que no ha formado complejos, se libera del primer soporte sólido utilizando un método apropiado para el primer marcador liberable en particular que se emplee.

En una realización, los complejos de afinidad aptámero-diana unidos al soporte sólido se tratan entonces con un agente que introduce un segundo marcador para el componente de molécula diana de los complejos de afinidad aptámero-diana. En una realización, la diana es una proteína o un péptido, y la diana está biotinilada tratándola con NSH-PEO4-biotina. El segundo marcador que se introduce en la molécula diana puede ser el mismo o diferente del marcador de captura del aptámero. Si el segundo marcador es el mismo que el primer marcador, o el marcador de captura del aptámero, los sitios de captura libres del primer soporte sólido se pueden bloquear 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 la diana. Los métodos de marcado, y en particular, el marcado de dianas tales como péptidos y proteínas se describen en la Patente de EE. UU. Nº 7.855.054. En otras realizaciones, el marcado de la diana se lleva a cabo en cualquier otro punto del ensayo antes del inicio de la partición de la Captura-2.

La partición de la Captura-1 se completa liberando los aptámeros y los complejos de afinidad aptámero-diana del primer soporte sólido. En una realización, el primer marcador liberable es un resto fotoescindible que se escinde por radiación con una lámpara UV en condiciones que escinden $\geq 90\%$ del primer marcador liberable. En otras realizaciones la liberación se consigue por el método apropiado para el resto liberable seleccionado en el primer marcador liberable. Los complejos de afinidad aptámero-diana puede eluirse y recolectar para su uso posterior en el ensayo o se puede poner en contacto con otro soporte sólido para llevar a cabo el resto de etapas del ensayo.

En una realización, la mezcla puede someterse opcionalmente a un desafío cinético. El desafío cinético ayuda a reducir la unión no específica entre aptámeros y moléculas no diana. En una realización, se añaden 10 mM de sulfato de dextrano a los complejos de afinidad aptámero-diana, y la mezcla se incuba durante aproximadamente 15 minutos. Otros competidores incluyen pero no se limitan ácidos nucleicos competidores. En otra realización, el desafío cinético se inicia llevando a cabo la elución de la Captura-1 en presencia de 10 mM de sulfato de dextrano. En otras realizaciones, el desafío cinético se lleva a cabo tras la etapa de unión en equilibrio y antes de la partición de la Captura-2. En otras realizaciones, el desafío cinético se lleva a cabo por dilución.

En una realización, la partición de la Captura-2 se lleva a cabo para retirar el aptámero libre. Como se ha descrito anteriormente, en una realización, se puede añadir un segundo marcador que se utiliza en la partición de la Captura-2 a la diana mientras el complejo de afinidad aptámero-diana sigue en contacto con el soporte sólido utilizado en la partición de la Captura-1. En otras realizaciones, se puede añadir el segundo marcador a la diana en otro punto del ensayo antes del inicio de la partición de la Captura-2. La mezcla se pone en contacto con un soporte sólido, teniendo el soporte sólido un elemento de captura (segundo) adherido a su superficie que es capaz de unirse al

marcador de captura de la diana (segundo marcador), preferentemente con alta afinidad y especificidad. En una realización, el soporte sólido son perlas magnéticas (tales como DynaBeads MyOne Streptavidin C1) contenidas en un pocillo de una placa de microtitulación y el elemento de captura (segundo elemento de captura) es la estreptavidina. Las perlas magnéticas proporcionan un método conveniente para la separación de los componentes separados de la mezcla. Los complejos de afinidad aptámero-diana contenidos en la mezcla se unen de esta manera al soporte sólido por medio de la interacción de unión del marcador de captura de la diana (segundo) y el segundo elemento de captura del segundo soporte sólido. El complejo de afinidad aptámero-diana se separa entonces del resto de la mezcla, por ejemplo, lavando el soporte con soluciones tampón, incluyendo tampones que comprenden disolventes orgánicos que incluyen pero no se limitan al glicerol.

Los aptámeros se eluyen entonces selectivamente de los complejos aptámero-diana con tampones que comprenden sales caotrópicas de entre el grupo que incluye pero no se limita a perclorato sódico y cloruro de litio- Los aptámeros retenidos en las perlas de Captura -2 mediante la interacción aptámero/aptámero no se eluyen por este tratamiento.

En otra realización, el aptámero liberado en la partición de la Captura-2 es detectado y es cuantificado opcionalmente por cualquiera de los métodos de detección de ácido nucleico adecuado, tales como por ejemplo, hibridación con una micromatriz de ADN, Q-PCR, espectrometría de masas, ensayo Invader, secuenciación de próxima generación, y similares. Estos métodos de detección se describen con mayor detalle posteriormente.

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

Se puede utilizar cualquier de los métodos descritos en el presente documento para llevar a cabo un ensayo de analito único o un análisis multiplexado de una muestra de ensayo. Cualquiera de los análisis multiplexados puede incluir el uso de dos, decenas, cientos o miles de aptámeros para ensayar simultáneamente un número igual de moléculas diana en una muestra de ensayo, tal como una muestra biológica, por ejemplo. En estas realizaciones, se introduce una pluralidad de aptámeros, cada uno de los cuales reconocen y opcionalmente se entrecruza con un analito diferente, en la muestra de ensayo y se lleva a cabo cualquiera de los ensayos que se han descrito anteriormente. Tras la liberación de los aptámeros, se puede emplear cualquiera de los métodos de detección de ácido nucleico multiplexado para medir los diferentes aptámeros que se han liberado. En una realización, esto se puede conseguir por hibridación con sondas complementarias que se disponen separadamente en una superficie sólida. En otra realización, cada uno de los diferentes aptámeros se puede detectar basándose en el peso molecular utilizando espectrometría de masas. En otra realización más, cada uno de los diferentes aptámeros se puede detectar basándose en la movilidad electroforética, tal como, por ejemplo, en electroforesis capilar, en un gel o por cromatografía líquida. En otra realización, se pueden utilizar sondas PCR únicas para cuantificar cada uno de los aptámeros diferentes utilizando Q-PCR.

En cada uno de los ensayos que se desvelan en el presente documento, se puede utilizar un desafío cinético para aumentar la especificidad del ensayo y para reducir la unión no específica. En una realización, que se puede emplear opcionalmente en cada uno de los ensayos descritos en el presente documento, se puede conseguir una reducción adicional de la unión no específica por pre-incubación de un competidor con la muestra de ensayo o por adición de un competidor a la mezcla durante la unión en equilibrio. En una realización se pre-incuban 4 mM de un oligonucleótido competidor Z-block (5'-(ACZZ)_nAC-3', donde Z = 5-bencil-dUTP) durante aproximadamente 5 minutos con la mezcla de ensayo.

Kits

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a kits útiles para llevar a cabo convenientemente cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento para analizar las muestras de ensayo. Para aumentar la versatilidad de los métodos desvelados, se pueden proporcionar reactivos en una combinación envasada, en el mismo envase o por separado, de manera que la relación de los reactivos proporcione una optimización sustancial del método y el ensayo. Los reactivos pueden estar en envases separados o distintos reactivos pueden combinarse en uno o más envases dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos.

Un kit comprende, en una combinación envasada, al menos un aptámero marcado y uno o más soportes sólidos, cada uno incluyendo al menos un agente de captura. El kit puede incluir también soluciones de lavado tales como un medio tampón acuoso para la dilución de la muestra así como lavado de matriz, reactivos de preparación de muestras, y demás. El kit puede contener además reactivos útiles para introducir un segundo marcador, generalmente por medio de la modificación o derivación de la diana. Además, el kit puede contener reactivos adecuados para llevar a cabo el desafío cinético deseado durante el método analítico. Las cantidades relativas de los distintos reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar las concentraciones de reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que es necesario que se produzcan durante el ensayo y además para

optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, se pueden proporcionar uno o más de los reactivos como un polvo seco, habitualmente liofilizado, que incluyen excipientes, que al disolverse proporcionarán la solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para llevar a cabo un método o ensayo de acuerdo con la presente divulgación. El kit puede incluir además una descripción por escrito de un método de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos 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 una afinidad específica por una molécula diana y que comprende un marcador; y un soporte sólido en el que el soporte sólido incluye al menos un agente de captura dispuesto en él, y en el que el elemento de captura es capaz de asociarse con el marcador del 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 una afinidad específica para una molécula diana y que comprende un marcador y una marca; y un soporte sólido, en el que el soporte sólido incluye al menos un agente de captura dispuesto en él, y en el que el elemento de captura es capaz de asociarse con el marcador del 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 una afinidad específica para una molécula diana y que comprende un marcador liberable y una marca; y un soporte sólido, en el que el soporte sólido incluye al menos un agente de captura dispuesto en él, y en el que el elemento de captura es capaz de asociarse con el marcador del aptámero.

Además, cualquiera de los kits descritos anteriormente puede contener reactivos y materiales para llevar a cabo un desafío cinético durante el método de detección del kit.

Como se utiliza en el presente documento "Captura-1" se refiere a la partición de un complejo de afinidad aptámero-diana o complejo covalente aptámero-diana. El objetivo de la Captura-1 es retirar sustancialmente todos los componentes de la muestra de ensayo que no se asocia con el aptámero. Retirando la mayoría de dichos componentes se mejorará en general la eficacia de marcado de la diana retirando las moléculas no dianas de la etapa de marcado de la diana utilizada para la captura de Captura-2 y puede dar lugar a una señal de fondo menor en el ensayo. En una realización, se une un marcador al aptámero bien antes del ensayo, durante la preparación del ensayo, o durante el ensayo adjuntando el marcador al aptámero. En na realización, el marcador es un marcador liberable. En una realización el marcador liberable comprende un enlazador escindible y un marcador. Como se ha descrito anteriormente, el aptámero marcado se puede capturar en un soporte sólido en el que el soporte sólido comprende un elemento de captura apropiado para el marcador. El soporte sólido se puede lavar entonces como se ha descrito en el presente documento antes del equilibrado con la muestra de ensayo para retirar cualquier material no deseado (Captura-0).

Como se utiliza en el presente documento "Captura-2" se refiere a la partición de un complejo de afinidad aptámero-diana o complejo covalente aptámero-diana basándose en la captura de la molécula diana. El objetivo de la etapa de Captura-2 es retirar, el aptámero libre, o que no forma complejos de la muestra de ensayo antes de la detección y cuantificación opcional. Retirar el aptámero libre de la muestra permite la detección de los complejos de afinidad aptámero-diana o covalente aptámero-diana por cualquier técnica de detección de ácido nucleico adecuada. Cuando se utiliza la Q-PCR para la detección y cuantificación adicional, la retirada del aptámero libre es necesaria para la detección y cuantificación exacta 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 (o covalente) aptámero-diana (y el resto de la muestra de ensayo) utilizando reactivos que se pueden incorporar en las proteínas (y péptidos) y los complejos que incluyen proteínas (o péptidos), tales como, por ejemplo, un complejo de afinidad (o covalente) aptámero-diana. La proteína (o péptido) marcada y el complejo de afinidad (o covalente) aptámero-diana se pueden inmovilizar en un soporte sólido, haciendo posible la partición de la proteína (o péptido) y el complejo de afinidad (o covalente) aptámero-diana del aptámero libre. Dicho marcado puede incluir, por ejemplo, un resto de biotina que se puede incorporar a la proteína o péptido.

En una realización, se fija un marcador de Captura-2 a la proteína (o péptido) o bien antes del ensayo, durante la preparación del ensayo, o durante el ensayo por unión química del marcador a las dianas. En una realización el marcador de Captura-2 es un marcador liberable. En una realización, el marcador liberable comprende un enlazador escindible y un marcador. En general no es necesario sin embargo, liberar la proteína (o péptido) del soporte sólido de la Captura-2. Como se describe anteriormente, las dianas marcadas se pueden capturar en un segundo soporte sólido en el que el soporte sólido comprende un elemento de captura apropiado para el marcador de la diana. El soporte sólido se lava entonces con distintas soluciones tampón que incluyen soluciones tampón que comprenden disolventes orgánicos y soluciones tampón que comprenden sales y/o detergentes que contienen sales y/o detergentes.

Tras el lavado del segundo soporte sólido, los complejos de afinidad aptámero-diana se someten entonces a una

etapa de disociación en la que los complejos se destruyen para dar lugar a aptámeros libres mientras que las moléculas diana en general se mantienen unidas al soporte sólido por medio de la interacción de unión del elemento de captura y el marcador de captura de la diana. El aptámero se puede liberar del complejo de afinidad aptámero-diana por cualquier método que rompa la estructura del aptámero o la diana. Esto se puede conseguir por medio del lavado del soporte unido a los complejos de afinidad aptámero-diana en tampones altos en sales que disocian los complejos aptámero-diana unidos no covalentemente. Los aptámeros libres eluidos se recolectan y es detectados. En otra realización, se utiliza un pH alto o bajo para destruir los complejos de afinidad aptámero-diana. En otra realización se utilizan altas temperaturas para disociar los complejos de afinidad aptámero-diana. En otra realización, se puede utilizar una combinación de cualquiera de los métodos anteriores. En otra realización, se utiliza la digestión proteolítica del resto proteico del complejo de afinidad aptámero-diana para liberar el componente aptámero.

En el caso de los complejos covalentes aptámero-diana, la liberación del aptámero para la cuantificación posterior se consigue utilizando un enlazador escindible en la construcción de aptámero. En otra realización, un enlazador escindible en el marcador de la diana dará como resultado la liberación del complejo covalente aptámero-diana.

Como se utiliza en el presente documento, una "molécula competidora" y "competidor" se utilizan de manera intercambiable para referirse a cualquier molécula que puede formar un complejo no específico con una molécula no diana, por ejemplo, para evitar que vuelva a unir la molécula no diana no específicamente a un aptámero. Las "moléculas competidoras" o "competidores" se refieren a más de uno de dichos grupos de moléculas. Las moléculas competidoras incluyen oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón de cadena sencilla, y polidextrano (por ejemplo, sulfato de dextrano)), polímeros de fosfodiéster abásico, dNTP, y pirofosfato. En el caso de un desafío cinético que utilice un competidor, el competidor puede ser también una molécula que puede formar un complejo no específico con un aptámero libre o una proteína, por ejemplo, para evitar que el aptámero o proteína se vuelva a unir no específicamente a una molécula no diana. Dichas moléculas competidoras incluyen policationes (por ejemplo, espermina, espermidina, polilisina, y poliarginina) y aminoácidos (por ejemplo, arginina y lisina). Cuando se utiliza un competidor como desafío cinético se utiliza una concentración bastante alta con respecto a la concentración anticipada de proteína total o aptámero total presente en la muestra. En una realización se utiliza aproximadamente 10 mM de sulfato de dextrano como competidor en un desafío cinético. En una realización, el desafío cinético comprende la adición de un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana, e incubando la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana durante un tiempo mayor o igual a aproximadamente 30 segundos, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, y aproximadamente 60 minutos. En otra realización el desafío cinético comprende la adición de un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana y la incubación de la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana durante un tiempo de manera que la relación del nivel medido de complejo de afinidad aptámero-diana con respecto al nivel medido del complejo no específico está aumentada.

En algunas realizaciones, el desafío cinético se lleva a cabo diluyendo la muestra de ensayo con tampón de unión o cualquier otra solución que no aumenta significativamente la tasa natural de disociación de los complejos de afinidad aptámero-diana. La dilución puede ser aproximadamente de 2x, aproximadamente de 4x, o aproximadamente de 5x o cualquier dilución mayor. Las diluciones mayores proporcionan un desafío cinético más eficaz reduciendo la concentración de la proteína total y el aptámero tras la dilución y, por lo tanto, la tasa de su re-asociación. Si la dilución se utiliza para introducir un desafío cinético, la mezcla de muestra de ensayo posterior que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana se puede concentrar antes de posteriores procesamientos. Si es aplicable, esta concentración se puede conseguir utilizando métodos descritos en el presente documento con respecto a la partición opcional de cualquier aptámero libre de la muestra de ensayo y/o la retirada opcional de otros componentes de la muestra de ensayo que puedan reaccionar con el agente marcado. Cuando se utiliza la dilución como desafío cinético, la cantidad de dilución se selecciona para ser lo suficientemente alta para ser práctica, en vista de el volumen inicial de la muestra de ensayo y el deseo de recuperación del complejo de afinidad aptámero-diana del volumen final (diluido) sin incurrir en una pérdida significativa del complejo. En una realización, el complejo de afinidad aptámero-diana se diluye y la mezcla se incuba durante un tiempo \geq aproximadamente 30 segundos, \geq aproximadamente 1 minuto, \geq aproximadamente 2 minutos, \geq aproximadamente 3 minutos, \geq aproximadamente 4 minutos, \geq aproximadamente 5 minutos, \geq aproximadamente 10 minutos, \geq aproximadamente 30 minutos, y \geq aproximadamente 60 minutos. En otra realización, el complejo de afinidad aptámero-diana se diluye y las mezclas que contienen el complejo de afinidad aptámero-diana se incuban por un tiempo de manera que la relación del nivel medido de complejo de afinidad aptámero-diana respecto al nivel medido de complejo no específico está aumentado.

En algunas realizaciones, se lleva a cabo el desafío cinético de tal manera que el efecto de la dilución de la muestra y el efecto de un competidor se realizan simultáneamente. Por ejemplo, se puede diluir una muestra de ensayo con un gran volumen de competidor. Combinando estas dos estrategias de desafío cinético se puede proporcionar un desafío cinético más eficaz que el que se puede obtener utilizando 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 aproximadamente 10 mM. En una realización, el desafío cinético comprende la dilución de la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana, añadiendo

un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana, e incubado la mezcla que contienen el complejo de afinidad aptámero-diana durante un tiempo mayor o igual a 30 segundos, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, y aproximadamente 60 minutos. En otra realización, el desafío cinético comprende diluir la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana. añadiendo un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana e incubando la mezcla que contiene el complejo de afinidad aptámero-diana durante un tiempo tal que la relación del nivel medido de complejo de afinidad aptámero-diana con respecto al nivel medido del complejo no específico está aumentado.

Como se desvela en el presente documento, un aptámero puede comprender adicionalmente un "marcador", lo que se refiere a un componente que proporciona un medio para unir o inmovilizar un aptámero (y cualquier molécula diana a la que está unido) a un soporte sólido. Un "marcador" es un resto que es capaz de asociarse con un "elemento de captura". Los "marcadores" o "elementos de captura" se refieren a más de uno de dichos grupos de componentes. El marcador se puede unir o incluirse en el aptámero por cualquier método adecuado. En general, el marcador permite que el aptámero se asocia, directa o indirectamente con un elemento de captura o receptor que está anclado al soporte sólido. El elemento de captura se elige normalmente (o se diseña) para que sea altamente específico para esta interacción con el marcador y para mantener esa asociación durante las siguientes etapas de procesamiento o procedimientos. Un marcador puede facilitar la localización de un complejo de afinidad aptámero-diana (o complejo de afinidad covalente aptámero-diana) en una dirección definida espacialmente del soporte sólido. Por lo tanto, diferentes marcadores, pueden facilitar la localización de diferentes complejos covalentes aptámero-diana en diferentes direcciones definidas espacialmente de un soporte. Un marcador puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico cerrado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, 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 cual se puede diseñar o configurar un elemento de captura (o molécula enlazadora, como se describe posteriormente) para que se una o se asocie de otra manera con especificidad. En general, un marcador se configura de manera que no interactúe intramolecularmente con sí mismo o con el aptámero al que está unido o del que es parte. Si se utiliza SELEX para identificar un aptámero, el marcador se puede añadir al aptámero pre- o post-SELEX. En una realización, el marcador se incluye en el extremo 5' del aptámero post-SELEX. En otra realización, el marcador está incluido en el extremo 3' del aptámero post-SELEX. En otra realización más, los marcadores se pueden incluir tanto en el extremo 3' como 5' de los aptámeros en un proceso de modificación post-SELEX. En otra realización, el marcador puede ser un segmento interno del aptámero.

En una realización, el marcador es un grupo biotina y el elemento de captura es una proteína de unión a la biotina, tal como la avidina, estreptavidina, neutravidina, extravidina o traptavidina. Esta combinación se puede utilizar convenientemente en distintas realizaciones, ya que la biotina se incorpora fácilmente en los aptámeros durante la síntesis y las perlas de estreptavidina están disponibles fácilmente.

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

En una realización, el marcador es un polinucleótido que se diseña para hibridarse directamente con un elemento de captura que contienen una secuencia de polinucleótido complementaria. En este caso, se hace referencia al marcador a veces como "secuencia marcadora" y se hace referencia al elemento de captura como "sonda". En esta realización, el marcador se configura en general y la reacción de hibridación se llevó a cabo en condiciones tales que el marcador no se hibrida con una sonda distinta de la sonda que es perfectamente complementaria al marcador. Esto permite el diseño de un formato de ensayo múltiple ya que cada combinación marcador/sonda puede tener secuencias únicas.

En algunas realizaciones, el marcador comprende nucleótidos que son una parte del propio aptámero. Por ejemplo, si se utiliza SELEX para identificar el aptámero, el aptámero generalmente incluye un extremo 5' fijo separado de un extremo 3' fijado por una secuencia de nucleótidos que varía dependiendo del aptámero, es decir, una región variable. En una realización, el marcador puede comprender cualquier número adecuado de nucleótidos incluidos en un extremo fijo del aptámero, tal como, por ejemplo, el extremo fijo completo o cualquier parte de un extremo fijo, que incluye nucleótidos que son internos al extremo fijado. En otra realización, el marcador puede comprender cualquier número adecuado de nucleótidos incluidos en la región variable del aptámero, tal como por ejemplo, la región variable completa o cualquier parte de la región variable. En una realización adicional, el marcador puede comprender cualquier número de nucleótidos adecuado que se solapan con la región variable y uno de los extremos fijados, es decir, el marcador puede comprender una secuencia de nucleótidos que incluye cualquier parte (incluyendo todas) de la región variable y cualquier parte (incluyendo todas) de un extremo fijado.

En otra realización, un marcador se puede asociar directamente con una sonda y se une covalentemente a la sonda, ligando de esta manera covalentemente el aptámero a la superficie del soporte sólido. En esta realización, el marcador y la sonda puede incluir grupos reactivos adecuados que, al asociarse el marcador con la sonda, son lo suficientemente próximos entre ellos para someterse a una reacción química que produce un enlace covalente. La

reacción puede producirse espontáneamente o puede necesitar una activación, tal como, por ejemplo, foto-activación o activación química. En una realización, el marcador incluye un resto dieno y la sonda incluye un dienófilo, y da como resultado un enlace covalente a partir de una reacción de conjugación espontánea de Diels-Alder del dieno y el dienófilo. Se puede utilizar cualquier química complementaria adecuada, tal como, por ejemplo, la reacción N-Mannich, formación de disulfuro, reacción de Curtius, condensación de Aldol, formación de base de Schiff y adición de Michael.

En otra realización, el marcador se asocia indirectamente con una sonda, tal como, por ejemplo, por medio de una molécula enlazadora, como se describe adicionalmente posteriormente. En esta realización, el marcador puede incluir una secuencia de polinucleótido que es complementaria a una región o componente particular de una molécula enlazadora. El marcador se configura en general y la reacción de hibridación se lleva a cabo de manera que el marcador no se hibrida con una secuencia de polinucleótido distinta de la secuencia de polinucleótido incluida en la molécula enlazadora.

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

En algunas realizaciones, el componente marcador es bi-funcional ya que incluye la funcionalidad para la interacción específica con un elemento de captura en un soporte sólido o "sonda" como se define posteriormente (componente de asociación de la sonda), y funcionalidad para disociar la molécula a la que se une a partir del componente de asociación de la sonda del marcador. El medio para disociar el componente de asociación de la sonda del marcador incluye medios químicos, medios fotoquímicos u otros medios que dependen del marcador particular que se emplee.

Como se utiliza en el presente documento, "elemento de captura", "sonda" o "receptor" se refiere a una molécula que se configura para asociarse, o directa o indirectamente, con un marcador. Un "elemento de captura", "sonda" o "receptor" es un grupo de copias de un tipo de molécula o un tipo de estructura multimolecular que es capaz de inmovilizar el resto que une el marcador a un soporte sólido asociándose, bien directa o indirectamente, con el marcador. "Elementos de captura", "sondas" o "receptores" se refieren a más de uno de dichos grupos de moléculas. Un elemento de captura, sonda o receptor puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico cerrado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, 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 se puede diseñar o configurar un marcador (o molécula enlazadora) para unirse o asociarse de otra manera con especificidad. Un elemento de captura, sonda o receptor se puede unir a un soporte sólido bien covalente o no covalentemente por cualquier método adecuado.

Aunque las expresiones "elemento de captura", "sonda" y "receptor" se utilizan de manera intercambiable, sonda en general se refiere a una secuencia de polinucleótido. En una realización, la sonda incluye un polinucleótido que tiene una secuencia que es complementaria a una secuencia polinucleotídica marcadora. En esta realización, la secuencia de la sonda se configura en general y la reacción de hibridación se lleva a cabo en condiciones en las que la sonda no se hibrida con una secuencia de nucleótidos distinta que la del marcador para la que la sonda incluye la secuencia complementaria (es decir, la sonda se configura en general y la hibridación se lleva a cabo en condiciones tales que la sonda no se hibrida con un marcador o aptámero diferente).

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

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

En algunas realizaciones, la sonda de captura es bi-funcional en cuanto a que incluye funcionalidad para interacción específica con un marcador polinucleotídico, y funcionalidad para disociar la sonda del soporte sólido de manera que la sonda y el aptámero se liberan simultáneamente. El medio para disociar la sonda del soporte sólido incluye medios, químicos, medios fotoquímicos u otros medios que dependen de la sonda de captura particular que se emplee.

Debido a la naturaleza recíproca de la interacción entre una pareja particular de marcador y elemento de captura, un

marcador de una realización se puede utilizar como elemento de captura en otra realización, y un elemento de captura en una realización se puede utilizar como marcador en otra realización. Por ejemplo, un aptámero con un marcador biotina se puede capturar con estreptavidina fijada a un soporte sólido en una realización, mientras que un aptámero con un marcador estreptavidina puede capturarse con biotina fijada en un soporte sólido en otra realización.

Como se utiliza en el presente documento, un enlazador es una estructura molecular que se utiliza para conectar dos grupos funcionales o estructuras moleculares. Como se utiliza en el presente documento, “enlazador espaciador” o más simplemente “espaciador” se refiere a un grupo de átomos benignos que proporcionan una separación o espaciado entre dos grupos funcionales diferentes en un aptámero. Como se utiliza en el presente documento, un elemento “liberable” o “escindible”, resto, o enlazador se refiere a una estructura molecular que se puede romper para producir dos componentes separados. Un elemento liberable (o escindible) puede comprender una única molécula en la que se puede romper un enlace químico (al que se hace referencia en el presente documento como “enlazador escindible en línea”), o puede comprender dos o más moléculas en las que se puede romper o destruir la interacción no covalente (al que se hace referencia en el presente documento como “enlazador de hibridación”).

En algunas realizaciones, es necesario separar espacialmente ciertos grupos funcionales de otros con el fin de evitar la interferencia con las funcionalidades individuales. Por ejemplo, la presencia de un marcador, que absorba ciertas longitudes de onda de luz, próximo a un grupo fotoescindible puede interferir con la eficacia de fotoescisión. Por lo tanto es deseable separar dichos grupos con un resto que no interfiera que proporcione una separación espacial suficiente para recuperar la actividad completa de fotoescisión, por ejemplo. En algunas realizaciones, un “enlazador espaciador” se ha introducido en un aptámero con ambas funcionalidades de marcador y fotoescisión.

En una realización, se introducen enlazadores espaciadores en el aptámero durante la síntesis y así puede estar comprendido por varios espaciadores fosforamídita, incluyendo pero no limitándose a cadenas de carbono alifáticas de longitudes de 3, 6, 9, 12 y 18 átomos de carbono, cadenas de polietilenglicoles de longitudes de 1, 3, y 9 unidades de etilenglicol, o un resto tetrahidrofurano (denominado dSpacer (Glenn Research) o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otra estructura o componente químico que se puede diseñar o configurar para añadir una longitud a lo largo de una matriz fosfodiéster. En otra realización, el enlazador 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 abásicos de ribosa o desoxirribosa. Nótese que dichas secuencias se diseñan de manera que no interfieran con la estructura o función del aptámero.

Como se utiliza en el presente documento, un “enlazador de hibridación” se refiere a un enlazador que comprende dos o más moléculas en las que una interacción no covalente se puede romper o alterar por medio de métodos químicos o físicos. En algunas realizaciones, se utiliza un enlazador de hibridación para unir un aptámero a un marcador, formando de esta manera un marcador liberable. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador de hibridación en cualquiera de los ensayos descritos para crear una conexión liberable entre un aptámero y una biotina (por ejemplo, en los ensayos de afinidad y ensayos de entrecruzamiento) o una conexión liberable entre un aptámero y un grupo de fotoentrecruzamiento (por ejemplo, en ensayos de entrecruzamiento).

En una realización, un enlazador de hibridación comprende dos ácidos nucleicos que se hibridan para formar un enlace no covalente. En una realización, uno de los ácidos nucleicos que forman 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 se puede conseguir por cualquier mecanismo adecuado para alterar los dúplex de ácido nucleico (mientras que mantiene la compatibilidad con el ensayo). En una realización, se utilizan 20 mM de NaOH para alterar el enlazador de hibridación en el ensayo de captura de fotoentrecruzamiento doble. Una molécula de enlazador 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 cerrados, oligosacáridos, polisacáridos, anticuerpos, aficuerpos, miméticos de anticuerpos o fragmentos, receptores, ligandos, lípidos, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores o cualquier otra estructura o componente químico que se pueda diseñar o configurar para formar una estructura liberable.

En una realización, el marcador liberable consiste en al menos un polinucleótido que consiste en un número adecuado de nucleótidos. En una realización, un componente de polinucleótido de una molécula enlazadora incluye al menos aproximadamente 10 nucleótidos. En otra realización, un componente de polinucleótido de una molécula enlazadora incluye desde aproximadamente 10 a aproximadamente 45 nucleótidos. En otra realización más, un componente de polinucleótido de una molécula enlazadora incluye al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Las moléculas enlazadoras que se utilizan en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento pueden incluir componentes polinucleotídicos que tienen o el mismo número de nucleótidos o un número diferente de nucleótidos.

Un "soporte sólido" se refiere a cualquier sustrato que tiene una superficie en el que se pueden fijar moléculas, directa o indirectamente, por medio de enlaces covalentes o no covalentes. El soporte sólido puede incluir cualquier material de sustrato que sea capaz de proporcionar un soporte físico para la captura de elementos o sondas que se unen a la superficie. El material es capaz en general de soportar condiciones relacionadas con la fijación de los elementos de captura o sondas a la superficie y cualquier tratamiento, manipulación o procesamiento posterior que se encuentra en la realización de un ensayo. Los materiales pueden ser de origen natural, sintético, o una modificación de material de origen natural. Los materiales del soporte sólido adecuados pueden incluir silicio, un chip de placa de silicio, grafito, superficies especulares, laminados, membranas, cerámicas, plásticos (incluyendo polímeros tales como, por ejemplo poli(cloruro de vinilo), copolímeros de ciclo-olefina, geles o perlas de agarosa, poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), poli-tetrafluoroetileno (PTFE o Teflon®), nailon, poli(butirato de vinilo)), germanio, arsenuro de galio, oro, plata, películas de Langmuir Blodgett, un chip de flujo, etc., que se utilizan por sí mismos o en conjunción con otros materiales. Se pueden considerar materiales rígidos adicionales, tales como cristal, que incluya el silicio e incluye además, por ejemplo, cristal que está disponible como Biocristal. Otros materiales que se pueden emplear incluyen materiales porosos, tales como, por ejemplo, perlas de cristal de poro controlado, Sepharose® reticulada o resinas de agarosa en perlas, o copolímeros de bis-acrilamida y azalactona reticulada. Otras perlas incluyen nanopartículas, perlas de polímero, perlas de núcleo sólido, perlas paramagnéticas o microperlas. Se contemplan también, cualquier otro material que se conocen en la técnica que son capaces de tener uno o más grupos funcionales, tales como cualquiera de los grupos amino, carboxilo, tiol o hidroxilo funcionales, por ejemplo, que se incorporan en su superficie.

El material que se utiliza para un soporte sólido se puede tomar de cualquier variedad de configuraciones que varían desde simple a compleja. El soporte sólido puede tener cualquier tipo de forma, incluyendo una tira, placa, disco, barra, partícula, perla, tubo, pocillo (de microtitulación), 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 puede estar también en forma de un gel o pasta de partículas empaquetadas estrechamente (como en una matriz de columna) o más separadas.

En una realización, el soporte sólido con un elemento de captura fijado se utiliza para capturar los complejos de afinidad de aptámero marcado-diana o complejos covalentes de aptámero-diana de una mezcla de ensayo. En un ejemplo particular, cuando el marcador es un resto de biotina, el soporte sólido puede ser una perla o resina revestida de estreptavidina, tales como Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynabeads MyOne Streptavidin, Dynabeads M-270 Streptavidin (Invitrogen), Resina Agarosa Estreptavidina (Pierce), Resina Ultralink Streptavidin, perlas MagnaBind Streptavidin (ThermoFisher Scientific), BioMag Streptavidin, ProMag Streptavidin, Silica Streptavidin (Bangs Laboratories), Sepharose Streptavidin de altas prestaciones (GE Healthcare), Microsfemas de Poliestireno Estreptavidina (Microsfemas-Nanosferas), Partículas de poliestireno revestidas de estreptavidina (Spherotech), o cualquier otra perla o resina revestida de estreptavidina que utiliza habitualmente un experto en la técnica para capturar moléculas marcadas con biotina.

Como se ha descrito anteriormente, un objetivo de la presente invención es convertir una señal proteica en una señal de aptámero. Como resultado, la cantidad de aptámeros recolectados/detectados es indicativa de, y puede ser directamente proporcional a, la cantidad de moléculas diana unidas a la cantidad de moléculas diana de una muestra. Se pueden emplear varios esquemas de detección sin eluir el complejo de afinidad aptámero-diana o covalente aptámero-diana, del segundo soporte sólido tras la partición en la Captura-2. Además de las siguientes realizaciones de métodos de detección, serán conocidos otros métodos de detección por un experto en la técnica.

Muchos métodos de detección necesitan que un marcador explícito se incorpore en el aptámero antes de la detección. En estas realizaciones, pueden incorporarse marcadores, tales como colorantes fluorescentes o quimioluminiscentes en los aptámeros durante o tras la síntesis utilizando técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos. Se pueden incorporar marcadores radioactivos o durante la síntesis o tras la síntesis utilizando reacciones enzimáticas convencionales con los reactivos apropiados. El marcado puede producirse también tras la partición y elución en la Captura -2 utilizando técnicas enzimáticas adecuadas. Por ejemplo, utilizando un cebador con los marcadores mencionados anteriormente, la PCR incorporará marcadores en el producto de amplificación de los aptámeros eluidos. Cuando se utiliza una técnica en gel para la cuantificación, se pueden incorporar marcadores de diferente tamaño de masa utilizando también PCR. Estos marcadores de masa pueden incorporar también diferentes colorantes fluorescentes o quimioluminiscentes para una capacidad de multiplexado adicional. Los marcadores se pueden añadir indirectamente a los aptámeros utilizando un marcador específico incorporado en el aptámero, sea durante la síntesis o tras la síntesis, y entonces se añade una sonda que se asocia con el marcador y alberga el marcador. Los marcadores incluyen los que se han descrito anteriormente así como enzimas que se utilizan en ensayos convencionales para lecturas colorimétricas, por ejemplo, Estas enzimas funcionan en combinación con sustratos enzimáticos e incluyen enzimas tales como, por ejemplo, peroxidasa de rábano rústico (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). Los marcadores pueden incluir también materiales o compuestos que son grupos funcionales electroquímicos para la detección electroquímica.

Por ejemplo, el aptámero puede marcarse, como se ha descrito anteriormente, con un isótopo radioactivo tal como ³¹P antes de poner en contacto la muestra de ensayo. Empleando cualquiera de los cuatro ensayos básicos, y

variaciones de los mismos como se expuesto anteriormente, la detección de aptámeros se puede conseguir simplemente por cuantificación de la radioactividad en el segundo soporte sólido al final del ensayo. Los recuentos de radiactividad serán directamente proporcionales a la cantidad de diana en la muestra de ensayo original. De manera similar, 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 de fluorescencia simple directamente en el segundo soporte sólido. Un marcador quimioluminiscente o un punto cuántico se puede emplear de manera similar para la lectura directa en el segundo soporte sólido, sin la necesidad de la elución del aptámero.

Eluyendo el aptámero o liberando el complejo covalente fotoaptámero-diana del segundo soporte sólido se pueden emplear esquemas de detección adicionales además de los que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, el aptámero, fotoaptámero o complejo covalente fotoaptámero-diana liberados se pueden procesar en un gel PAGE y detectarse y opcionalmente cuantificarse con una tinción de ácido nucleico, tal como Oro SYBR. De manera alternativa, el aptámero, fotoaptámero o complejo covalente de fotoaptámero liberados se pueden detectar y cuantificar utilizando electroforesis en gel capilar (CGE) utilizando un marcador fluorescente incorporado en el aptámero como se describe anteriormente. Otro esquema de detección emplea PCR cuantitativa para detectar y cuantificar el aptámero eluido utilizando verde SYBR, por ejemplo. De manea alternativa se puede emplear un ensayo de ADN Invader® para detectar y cuantificar el aptámero eluido. Otro esquema de detección alternativo emplea secuenciación de próxima generación.

En otra realización, la cantidad o concentración del complejo de afinidad aptámero-diana (o complejo covalente aptámero-diana) se determina utilizando una "baliza molecular" durante un procedimiento de replicación (véase, por ejemplo, Tyagi et al., Nat. Biotech. 16:49 53, 1998; U.S. Pat. No. 5.925.517). Una baliza molecular es una sonda de ácido nucleico específica que se pliega en un bucle horquillado y contiene un fluoróforo en un extremo y un interruptor en el otro extremo de la estructura horquillada de manera que se genera una pequeña señal o ninguna por el fluoróforo cuando la horquilla se forma. La secuencia del bucle es específica para una secuencia de polinucleótido diana y, al hibridarse con la secuencia de aptámero la horquilla se despliega y genera de esa manera una señal fluorescente.

Para la detección multiplexada de un pequeño número de aptámeros que aún están unidos al segundo soporte sólido se pueden emplear colorantes fluorescentes con diferentes espectros de excitación/emisión para detectar y cuantificar dos, o tres, o cinco, o hasta diez aptámeros individuales. De manera similar se pueden emplear diferentes cuantos puntuales para las lecturas multiplexadas. Los cuantos puntuales se pueden introducir tras la partición de aptámero libre del segundo soporte sólido. Utilizando secuencias de hibridación específicas de aptámero unidas a cuantos puntuales únicos, se pueden llevar a cabo lecturas multiplexadas para 2, 3, 5 y hasta 10 aptámeros. También se puede utilizar el marcado de diferentes aptámeros con diferentes isótopos radioactivos que se pueden detectar individualmente, tales como, ³²P, ¹²⁵I, ³H, ¹³C, y ³⁵S, para lecturas múltiples limitadas.

Para la detección múltiple de aptámeros liberados del segundo soporte sólido de la Catch-2, se puede utilizar 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 de aptámero junto con la cuantificación del nivel de aptámero. Los métodos incluyen pero no se limitan a hibridación en chip de ADN, hibridación en microperlas, secuenciación de próxima generación y análisis CGE.

En una realización, se utiliza una matriz de hibridación ADN, o chip, para hibridar cada aptámero o fotoaptámero con una única o serie de únicas sondas inmovilizadas en un portaobjetos o chip tal como las matrices Agilent, matrices BeadChip de Illumina, matrices NimbleGEn o matrices impresas a medida. Cada sonda única es complementaria de una secuencia del aptámero. La secuencia complementaria puede ser un marcador de hibridación único incorporado en el aptámero, o una parte de la secuencia de aptámero, o la secuencia de aptámero completa. Los aptámeros liberados del soporte sólido Captura-2 se añaden a un tampón de hibridación apropiado y se procesan utilizando métodos de hibridación convencional. Por ejemplo, la solución de aptámero se incuba durante 12 horas con matriz de hibridación ADN a aproximadamente 60 °C para asegurar la rigurosidad de la hibridación. Las matrices se lavan y luego se exploran en un portaobjetos de escáner fluorescente, que produce una imagen de la intensidad de hibridación de aptámero en cada actuación de la matriz. La segmentación de imágenes y la cuantificación se consigue utilizando un software de procesamiento de imágenes, tal como ArrayVision. En una realización, los ensayos de aptámeros multiplexados se pueden detectar utilizando hasta 25 aptámeros, hasta 50 aptámeros, hasta 100 aptámeros, hasta 200 aptámeros, hasta 500 aptámeros, hasta 1000 aptámeros, y hasta 10.000 aptámeros.

En una realización se utilizan microperlas direccionables que tienen sondas ADN únicas complementarias a los aptámeros como se ha descrito anteriormente para la hibridación. Las microperlas se pueden direccionar con colorantes fluorescentes únicos, tales como tecnología de perlas Luminex, o se utilizan marcadores de códigos de barras como en la tecnología Illumina VeraCode, o transpondedores alimentados con láser. En una realización, los aptámeros liberados de soporte de Captura-2 se añaden a un tampón de hibridación apropiado y se procesan utilizando métodos de hibridación de microperlas convencionales. Por ejemplo, la solución de aptámero se incuba durante dos horas con un grupo de microperlas a aproximadamente 60 °C para asegurar la rigurosidad de la hibridación. Las soluciones se procesan entonces en un instrumento Luminex que hace el recuento de los tipos individuales de perlas y cuantifica la señal fluorescente de aptámero. En otra realización, las 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 en una superficie enrejada y se exploran utilizando un portaobjetos de escáner para la identificación y la cuantificación de la fluorescencia. En otra realización, las microperlas transpondedoras se incuban con la muestra de aptámeros a aproximadamente 60 °C y luego se cuantifican utilizando un dispositivo apropiado para las
- 5 microperlas transpondedoras. En una realización, se pueden detectar múltiples ensayos de aptámero por hibridación de microperlas utilizando hasta 25 aptámeros, hasta 50 aptámeros, hasta 100 aptámeros, hasta 200 aptámeros, y hasta 500 aptámeros.
- La muestra que contiene los aptámeros eluidos se pueden procesar para incorporar marcadores de masa únicos, junto con marcadores fluorescentes como se ha descrito anteriormente. Los aptámeros marcados de masa se inyectan entonces en un instrumento CGE, esencialmente un secuenciador ADN, y los aptámeros se identifican por sus masas únicas y se cuantifican utilizando la fluorescencia del colorante incorporado durante la reacción de marcador. Un ejemplo ilustrativo de esta técnica se ha desarrollado por Althea Technologies.
- 10 En muchos de los métodos descritos anteriormente, la solución de los aptámeros se puede amplificar y marcarse opcionalmente antes de la cuantificación. Se puede utilizar una ampliación por PCR convencional con la solución de aptámeros eluidos del soporte sólido de Captura-2. Dicha ampliación se puede utilizar antes de la hibridación en la matriz ADN, hibridación en microperlas, y lectura en CGE.
- 15 En otra realización, el complejo de afinidad aptámero-diana (o complejo covalente aptámero-diana) es detectado y/o cuantifica utilizando Q-PCR. Como se utiliza en el presente documento, "Q-PCR" se refiere a una reacción PCR que se lleva a cabo de manera, y en tales condiciones controladas para que los resultados del ensayo sean cuantitativos, es decir, el ensayo es capaz de cuantificar la cantidad o concentración de aptámero presente en la muestra de ensayo.
- 20 En una realización, la cantidad o concentración del complejo de afinidad aptámero-diana (o complejo covalente aptámero-diana) de la muestra de ensayo se determina utilizando PCR TaqMan®. Esta técnica se basa en general en la actividad exonucleasa 5'-3' de la enzima replicadora de oligonucleótido para generar una señal de una secuencia dirigida. Se selecciona una sonda TaqMan basándose en la secuencia del aptámero que se va a cuantificar y generalmente incluye un fluoróforo en el extremo 5', tal como 6-carboxifluoresceína, por ejemplo, y un interruptor en el extremo 3', tal como, por ejemplo, una 6-carboxitetrametilfluoresceína para generar una señal según se amplifica la secuencia del aptámero utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Según la polimerasa copia la secuencia de aptámero, la actividad exonucleasa libera el fluoróforo de la sonda, que está hibridado corriente abajo a partir de los cebadores PCR, generando de esta manera una señal. La señal aumenta según se produce el producto replicativo. La cantidad del producto PCR depende tanto del número de ciclos replicativos así como la concentración de partida del aptámero.
- 25 En otra realización, la cantidad o concentración de un complejo de afinidad aptámero-diana (o el complejo covalente aptámero-diana) se determina utilizando un colorante fluorescente intercalado durante el proceso replicativo. El colorante intercalado, tal como por ejemplo, verde SYBR®, genera una gran señal fluorescente en presencia de ADN de doble cadena en comparación con la señal fluorescente generada en presencia de ADN de cadena sencilla. Como el producto de ADN de doble cadena se forma durante la PCR, la señal producida por el colorante aumenta. La magnitud de la señal producida es dependiente tanto del número de ciclos de PCR como de la concentración inicial del aptámero.
- 30 En otra realización, el complejo de afinidad aptámero-diana (o complejo covalente aptámero-diana) se detecta y/o cuantifica utilizando espectrometría de masas. Se pueden introducir marcadores de masas únicos utilizando las técnicas enzimáticas descritas anteriormente. Para la lectura de la espectroscopia de masas, no se necesita un marcador de detección, más bien se utiliza la propia masa para identificar y, utilizando técnicas que se utilizan comúnmente por los expertos en la técnica, cuantificarse basándose en la localización y el área bajo los picos de masas generados durante el análisis de espectroscopia de masas. Un ejemplo que utiliza la espectrometría de masas. Un ejemplo que utiliza la espectrometría de masas es el sistema MassARRAY® desarrollado por Sequenom.
- 35 Se puede utilizar un programa de computadora para llevar a cabo uno o más etapas de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento. Otro aspecto de la presente divulgación es un producto de programa de computadora que comprende un medio de almacenamiento leíble por computadora que tiene un programa de computadora almacenado en él, que cuando se carga en una computadora, ejecuta o ayuda a la realización de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.
- 40 Un aspecto de la divulgación es un producto de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, a saber, un resultado del ensayo, que se puede evaluar en el sitio del ensayo o puede enviarse a otro sitio para la evaluación y comunicación a una parte interesada en una localización remota, si así se desea. Como se utiliza en el presente documento "localización remota" se refiere a una localización que es físicamente diferente que en la que se obtienen los resultados. En consecuencias, los resultados se pueden enviar a distintas estancias, un edificio diferente, una parte de la ciudad diferente, una ciudad diferente, y así. Los datos se pueden transmitir por cualquier medio adecuado tal como, por ejemplo, un facsímil, correo, suministro nocturno, correo electrónico, ftp, mensaje de
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

voz, y similares.

“Comunicar” la información se refiere a la transmisión de los datos que representan esa información como señales eléctricas en un canal de comunicación adecuado (por ejemplo, una red pública o privada). “Enviar” un artículo se refiere a cualquier medio para conseguir que el artículo desde una localización a la siguiente, sea por transporte físico del artículo o por otra manera (si es posible) e incluye, al menos en el caso de los datos, el transporte físico de un medio que alberga los datos o comunicando los datos.

Ejemplos

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

Todo lo anterior describe la divulgación en referencia a distintas realizaciones y ejemplos, Ninguna realización particular, ejemplo, o elemento de una realización particular o ejemplo se considera como un elemento o característica críticos, necesarios, o esenciales de cualquiera de las reivindicaciones.

Se apreciará que se pueden hacer distintas modificaciones y sustituciones a las realizaciones desveladas sin alejarse del alcance de la divulgación como se expone en las reivindicaciones posteriores. La memoria descriptiva, que incluye las figuras y ejemplos, se tiene que considerar de manera ilustrativa, más que restrictiva, y todas dichas modificaciones y sustituciones se consideran incluidas en el alcance de la divulgación. En consecuencia, el alcance de la divulgación se puede determinar por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales, más que por los ejemplos. Por ejemplo, las etapas mencionadas en cualquiera de los métodos o procedimientos reivindicados se pueden ejecutar en cualquier orden factible y no se limitan a un orden que se presenta en cualquiera de las realizaciones, los ejemplos, o las reivindicaciones.

Ensayo de afinidad proteómica

Captura-0

Se añadieron 133 µl al 7,5 % de pasta de estreptavidina-agarosa en 1xSB17, Tw (40 mM de HEPES, 102 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, un 0,05 % de Tween-20) a los pocillos de una placa de filtro (0,45 µM placas HV Millipore (Durapore nº de cat. MAHVN4550)). Se descongeló la mezcla de aptámero 1,1x apropiada (todos los aptámeros contenían un fluoróforo Cy3 y un resto de biotina fotoescindible en el extremo 5') seguido por agitado. La mezcla de aptámero 1,1x se hirvió entonces durante 10 min, se agitó durante 30 s y se permitió que se enfriara a 20 °C en un baño de agua durante 20 min. El líquido de las placas de filtro que contenían una pasta de estreptavidina agarosa se removió entonces por centrifugación (1000x g durante 1 minuto). Se añadieron 100 µl de la mezcla de aptámeros a los pocillos de la placa de filtro (robóticamente). La mezcla se incubó a 25 °C durante 20 minutos en un aparato agitador a 850 rpm, protegida de la luz.

Lavados de Captura-0

Posteriormente a los 20 min de incubación la solución se retiró por medio de filtración al vacío. Se añadieron 190 µl de 1x tampón de prelavado de aptámero CAPS (50 mM de CAPS, 1 mM de EDTA, un 0,05 % de Tw-20, pH 11,0) y la mezcla se incubó durante 1 minuto mientras se agitaba. La solución de lavado CAPS se retiró entonces por medio de filtración al vacío. Entonces se repitió el lavado CAPS una vez. Se añadieron 190 µl de 1xSX17, Tw y la mezcla se incubó durante 1 minuto mientras se agitaba. El 1xSB17, Tw se retiró por medio de filtración al vacío. Se añadieron 190 µl adicionales de 1xSX17, Tw y la mezcla se incubó durante 1 min mientras se agitaba. El 1xSB17, Tw se retiró entonces por centrifugación (1 min a 1000x g). Después de retirar el 1xSB17, Tw, se añadieron 150 µl de tampón de almacenamiento de Captura-0 (10 mM de NaCl, 40 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, un 0,02 % de azida sódica, un 0,05 % de Tween-20) y la placa filtro se selló cuidadosamente solo en el perímetro de la placa y se almacenó a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

Preparación de la muestra

Setenta y cinco µl de diluyente de muestra al 40 % se colocaron en placas en una placa de muestra al 40 % (la muestra al 40 % final contenía: 20 µM de Z-block, 1 mM de benzamidina, 1 mM de EGTA, 40 mM de HEPES, 5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, un 1 % de Tween-20). Se colocaron en pacas ciento noventa y cinco µl de 1xSB17, Tw en una laca de muestra al 1 %. Se colocaron en placas noventa µl de 1xSB17, Tw en una placa de dilución de 1 a 10. Se colocaron en placas ciento treinta y tres µl de 1xSB17, Tw una placa de muestra al 0,005 %. Las muestras se descongelaron durante 10 min en una estación de descongelación Rack en una incubadora a 25 °C, y luego se removieron y se centrifugaron a 1000x g durante minuto. Se retiraron las tapas de los tubos. Las muestras se mezclaron (5 veces con 50 µl) y se transfirieron 50 µl de muestra al 100 % a la placa de muestra al 40 % que contenía los diluyentes de muestra. Entonces se mezcló la muestra al 40 % en la placa de muestra pipeteando repetidamente (110 µl 10 veces). Entonces se transfirieron cinco µl de muestra al 40 % a la placa de muestra al 1 % que contenía 1xSB17, Tw. De nuevo esta muestra se mezcló pipeteando repetidas veces (120 µl 10 veces). Tras el

mezclado, se transfirieron 10 µl de la muestra al 1 % a la placa de dilución de 1 a 10 que contenía 1xSB17, Tw que se mezcló pipeteando repetidas veces (75 µl 10 veces). Se transfirieron siete µl de la muestra al 0,1 % desde la placa de dilución 1 a 10 a la placa de muestra al 0,005 % que contenía 1xSB17, Tw, y se mezcló pipeteando repetidas veces (110 µl 10 veces).

5

Preparación de la placa antes del equilibrado

La solución de almacenamiento de la Captura-0 se retiró de las placas de filtro por medio de filtración al vacío. Se añadieron entonces ciento noventa µl de 1xSB17, Tw seguido por retirada de las placas de filtro por medio de filtración al vacío. Se añadieron entonces 190 µl adicionales de 1xSB17, Tw a las placas de filtro.

10

Equilibrado

Se retiró el tampón 1xSB17, Tw de las placas de filtro por centrifugación (1 min a 1000x g). Se añadieron 100 µl de la dilución de muestra adecuada a las placas de filtro (tres placas de filtro, una por cada dilución de muestra 40 %, 1 % o 0,005 %). Las placas de filtro se sellaron cuidadosamente solo en el perímetro de la placa, evitando presurizar los pocillos. La presión causará el vertido durante el equilibrado. Entonces se incubaron durante 3,5 horas a 28 °C en el aparato termoagitador a 850 rpm, protegido de la luz.

15

20 Procesamiento de la placa de filtro

Tras el equilibrado las placas de filtro se colocaron en el colector de vacío y la muestra se retiró por filtración al vacío. Se añadieron ciento noventa µl de biotina de lavado (100 µM de biotina en 1xSB17, Tw y se retiró el líquido se retiró por filtración al vacío. Entonces la muestra se lavó 5x con 190 µl de 1xSB17, Tw (filtración al vacío). Se añadieron cien µl de NHS-biotina 1 mM en 1xSB17, Tw (recién preparado) y se transfirieron las placas de filtro a una almohadilla absorbente y la mezcla se incubó durante 5 minutos con agitado. Se retiró el líquido por filtración al vacío. Se añadieron ciento veinticinco µl de glicina 20 mM en 1xSB17, Tw y el líquido se retiró por filtración al vacío. De nuevo se añadieron 125 µl de glicina 20 mM en 1xSB17, T2 y el líquido se retiró por filtración al vacío. Posteriormente las muestras se lavaron 6x con 190 µl de 1xSB17, Tw siendo retirado el líquido por filtración al vacío. Se añadieron entonces ochenta y cinco µl de tampón de fotoescisión (2 µM de Z-block en 1xSB17, T2) a cada una de las placas de filtro.

25

30

Fotoescisión

Las placas de filtro se transfirieron en almohadillas absorbentes y se radiaron durante 6 min con una lámpara de UV BlackRay con agitado (800 rpm, 25 °C). Las placas se rotaron 180 grados y se radiaron durante 6 minutos adicionales bajo la fuente de luz de la BlackRay. La placa de filtro del 40 % se colocó sobre una placa vacía de 96 pocillos. La placa de filtro del 1 % se apiló encima de la placa filtro del 40 %, y la placa de filtro del 0,005 % se apiló sobre la placa de filtro del 1 %. El conjunto de placas se centrifugó durante 1 min a 1000x g. La placa de 96 pocillos con la muestra eluida se colocó en la plataforma robótica. Se colocó un 60 % de glicerol en 1xSB17, Tw de la incubadora a 37 °C en la plataforma robótica.

35

40

Captura-2

Durante la realización del ensayo se añadieron 50 µl de perlas MyOne SA 10 mg/ml (500 µg) a una placa de 96 pocillos Omnitube ABgene para la Captura-2 y se colocó en el Cytomat. La placa de perlas de 96 pocillos de la Captura-2 se suspendió durante 90 s, se colocó en el bloque magnético durante 60 s y se retiró el sobrenadante. Todo el eluido de la Captura-1 se transfirió a la placa de perlas de la Captura-2 y se incubó en un termoagitador Peltier (1350 rpm, 5 min, 25 °C). La placa se transfirió a un imán a 25 °C durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante. Después se añadieron 75 µl de 1xSB17, Tw y la muestra se incubó en un agitador Peltier a 1350 rpm durante 1 minuto a 37 °C. Después se añadieron 75 µl de glicerol al 60 % en 1xSB17, Tw (calentado a 37 °C) y la muestra se incubó de nuevo en el agitador Peltier a 1350 rpm durante 1 minuto a 37 °C. La placa se transfirió a un imán calentado a 37 °C y se incubó durante 2 min seguido por la retirada del sobrenadante. Este ciclo de lavado a 37 °C con 1xSB17, Tw y glicerol se repitió dos veces más. La muestra se lavó entonces para retirar el glicerol residual con 150 µl de 1xSB17, Tw en un agitador Peltier (1350 rpm, 1 minuto, 25 °C), seguido por 1 minuto a 25 °C en el bloque magnético. El sobrenadante se retiró y se añadieron 150 µl de 1xSB17, Tw sustituido con 0,5 M de NaCl y se incubó a 1350 rpm durante 1 minuto (25 °C) seguido por 1 minuto a 25 °C en el bloque magnético. El sobrenadante se retiró con 75 µl de tampón de elución de perclorato (1,8 M de NaClO₄, 40 mM de PIPES, 1 mM de EDTA, un 0,05 % de Triton X-100, 1x de controles de hibridación, pH = 6,8) seguido por una incubación de 10 minutos en un agitador Peltier (25 °C, 1350 rpm). A continuación la placa se transfirió a un separador magnético y se incubó durante 90 s, y el sobrenadante se recuperó.

45

50

55

60

Hibridación

Se añadieron robóticamente veinte µl de la muestra eluida a una placa vacía de 96 pocillos. Se añadieron robóticamente cinco µl 10x tampón de bloqueo Agilent que contenía un segundo grupo de controles de hibridación a

65

las muestras eluidas. Luego se añadieron manualmente 25 µl de 2x de tampón de hibridación HiRPM Agilent a los pocillos. Se cargaron 40 µl de la mezcla de hibridación en la junta del portaobjetos Agilent. Se añadió la matriz 8 x 15 k en la junta de cubreobjetos y el sándwich se presionó con una pinza. El sándwich se incubó entonces rotándolo (20 rpm) durante 19 horas a 55 °C.

5

Lavado post-hibridación

El procesamiento del portaobjetos post-hibridación se llevó a cabo en un Procesador Little Dipper (SciGene, nº de cat. 1080-40-1). Se colocaron aproximadamente 750 µl de tampón de lavado 1 (tampón de lavado 1 oligo aCGH/ChIP- on-chip, Agilent Technologies) en una placa de tinción de cristal. Se colocaron aproximadamente 750 µl de tampón de lavado 1 (tampón de lavado 1 oligo aCGH/ChIP- on-chip, Agilent Technologies) en el Baño nº 1 del Procesador Little Dipper. Se colocaron aproximadamente 750 µl de tampón de lavado 2 (tampón de lavado 1 oligo aCGH/ChIP- on-chip, Agilent Technologies) calentado a 37 °C en el Baño nº 2 del procesador Little Dipper. Se ajustó la velocidad de agitado magnética en ambos baños a 5. El control de temperatura del Baño nº 1 no se encendió, mientras que el control de temperatura para el Baño nº 2 se fijó en 37 °C. Se separaron secuencialmente hasta veinte ensamblajes de portaobjetos/junta en la primera placa de tinción que contenía el tampón de lavado 1 y los portaobjetos se colocaron en gradilla de portaobjetos mientras se sumergían en el tampón de lavado 1. Una vez que se separaron todos los ensamblajes, la gradilla de portaobjetos se transfirió rápidamente al Baño nº 1 del Procesador Little Dipper y el protocolo de lavado automático comenzó. El procesador Little Dipper incubó los portaobjetos durante 30 s en el Baño nº 1 a una velocidad de 250 seguido por una transferencia al Baño nº 2 a 37 °C que contenía el Lavado 2 Agilent (Tampón de Lavado 2 Oligo aCGH/ChIP-on-chip, Agilent Technologies) y se incubó durante 300 s a una velocidad de 100. A continuación el Procesador Little Dipper transfirió la gradilla de portaobjetos a la centrifuga interna, donde los portaobjetos se centrifugaron durante 300 s a una velocidad de 690.

25 Formación de imágenes de micromatriz

Se formaron imágenes de la micromatriz de los portaobjetos con un escáner de micromatrices (Agilent G2565CA Microarray Scanner System, Agilent Technologies) en el canal Cy3 con una resolución de 5 µm ajustado a 100 % PMT y la opción XRD capacitada a 0,05. Las imágenes tiff resultantes se procesaron utilizando la característica del software de extracción Aligent versión 10.7.3.1 con el protocolo GE1_107_Sep09.

30

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

- 5 proporcionar un aptámero que está inmovilizado en un primer soporte sólido, teniendo el aptámero una afinidad de unión específica por la molécula diana y albergando un primer marcador, que tiene una afinidad por un primer elemento de captura, comprendiendo el primer soporte sólido un primer elemento de captura y estando el primer marcador asociado al primer elemento de captura para inmovilizar el aptámero sobre el primer soporte sólido, habiendo sido lavado dicho primer soporte sólido con una o más soluciones que disocian los aptámeros agregados;
- 10 poner en contacto dicho aptámero inmovilizado con la muestra de ensayo, en donde se forma un complejo de afinidad aptámero-diana, si dicha molécula diana está presente en dicha muestra de ensayo; retirar uno o más componentes de la mezcla no asociados a dicho primer soporte sólido;
- 15 unir un segundo marcador con una afinidad por un segundo elemento de captura a dicha molécula diana en el complejo de afinidad aptámero-diana; liberar el complejo de afinidad aptámero-diana de dicho primer soporte sólido; exponer el complejo de afinidad aptámero-diana liberado a un segundo soporte sólido que comprende un segundo elemento de captura y permitir que el segundo marcador se asocie a dicho segundo elemento de captura;
- 20 retirar cualquier componente de la mezcla no asociado a dicho soporte sólido; y eluir los aptámeros de dicho segundo soporte sólido con una o más soluciones que comprenden una sal caotrópica que altera las interacciones aptámero/analito.

25 2. Un método para detectar la presencia de, o determinar la cantidad de, una molécula diana en una muestra, comprendiendo el método:

- 30 proporcionar una pluralidad de aptámeros inmovilizados, en donde cada uno de dichos aptámeros es específico de una molécula diana, y en donde cada uno de dicha pluralidad de aptámeros comprende un primer marcador de captura escindible, estando dichos aptámeros inmovilizados en un soporte sólido que tiene sondas adheridas a la superficie del mismo, uniendo las sondas al primer marcador de manera que los aptámeros están inmovilizados en el soporte sólido por medio de la unión del primer marcador y la sonda;
- 35 poner en contacto los aptámeros inmovilizados con una muestra que contiene moléculas diana para formar una mezcla que contienen complejos aptámero-molécula diana unidos al soporte sólido; hacer la partición de los complejos aptámero-molécula diana unidos al soporte sólido del resto de la mezcla;
- 40 introducir un segundo marcador de captura en el componente de molécula diana de los complejos de aptámero-molécula diana; disociar los complejos aptámero-molécula diana de la superficie del soporte sólido, escindiendo el primer marcador de captura escindible;
- 45 proporcionar un segundo soporte sólido, que tiene sondas adheridas a la superficie del soporte, en donde las sondas son capaces de unirse al segundo marcador de captura en las moléculas diana; poner en contacto los complejos aptámero-molécula diana disociados con el segundo soporte sólido, de manera que los complejos aptámero-molécula diana se unan al segundo soporte por medio de la unión del segundo marcador de captura y la sonda;
- 50 eluir los aptámeros de dicho segundo soporte sólido con una o más soluciones tampón, que comprenden una sal caotrópica que altera las interacciones aptámero/analito pero soporta las interacciones aptámero/analito y la hibridación ADN;
- 55 disociar el aptámero-molécula diana; detectar los aptámeros libres.

3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dicho aptámero comprende al menos un nucleótido modificado en C-5.

4. El método de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde dicho aptámero comprende al menos una modificación química que comprende una sustitución química en una o más posiciones, que se seleccionan independientemente de una posición ribosa, de una posición desoxirribosa, de una posición fosfato y de una posición de base, seleccionándose opcionalmente dicha modificación química de manera independiente de entre el grupo que consiste en una modificación del azúcar en la posición 2', una 2' amino (2'-NH₂), una 2' fluoro (2'-F), una 2'-O-metil (2'-OMe), una modificación de pirimidina en la posición 5, una modificación de purina en la posición 8, una modificación en una amina exocíclica de citosina, una sustitución de 5-bromouracilo, una sustitución de 5-bromodesoxiuridina, una sustitución de 5-bromodesoxicidina, una modificación de matriz, una metilación, un protector 3' y un protector 5'.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además introducir un desafío cinético.

65 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho complejo de afinidad aptámero-diana tiene una velocidad de disociación baja.

7. El método de la reivindicación 6, en el que la velocidad de disociación de dicho complejo de afinidad aptámero-diana ($t_{1/2}$) es:
- (a) mayor o igual a 30 minutos;
 - (b) entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 240 minutos; o
 - (c) se selecciona de entre el grupo que consiste en ≥ 30 minutos, ≥ 60 minutos, ≥ 90 minutos, ≥ 120 minutos, ≥ 150 minutos, ≥ 180 minutos, ≥ 210 minutos y ≥ 240 minutos.
8. El método de la reivindicación 1, en el que una o más de dichas soluciones tampón comprenden un disolvente orgánico, opcionalmente el glicerol.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha sal caotrópica se selecciona de entre el grupo que consiste en perclorato sódico, cloruro de litio, cloruro magnésico y cloruro sódico.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho aptámero es detectado y opcionalmente es cuantificado utilizando un método que se selecciona de entre el grupo que consiste en Q-PCR, MS, secuenciación de próxima generación e hibridación, llevándose a cabo dicha Q-PCR opcionalmente utilizando TaqMan® PCR, un colorante fluorescente de intercalación durante el proceso de la PCR o una baliza molecular durante el proceso de la PCR.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el aptámero comprende un resto detectable, en donde dicho resto detectable se selecciona opcionalmente de entre el grupo que consiste en un colorante, un punto cuántico, un radiomarcador, un grupo funcional electroquímico y una enzima más un sustrato enzimático detectable, siendo dicho colorante preferentemente un colorante fluorescente.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho aptámero es un ácido nucleico de cadena sencilla o un ácido nucleico de doble cadena.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho aptámero comprende ADN, ARN o ambos ADN y ARN.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicha molécula diana se selecciona de entre el grupo que consiste en una proteína, un péptido, un carbohidrato, un polisacárido, una glucoproteína, una hormona, un receptor, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un sustrato, un metabolito, un análogo de estado de transición, un cofactor, un inhibidor, un fármaco, un colorante, un nutriente, un factor de crecimiento, un tejido y una sustancia controlada, preferentemente en donde dicha molécula diana es una proteína o un péptido.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicha muestra de ensayo se selecciona de entre el grupo que consiste en una muestra biológica, una muestra medioambiental, una muestra química, una muestra farmacéutica, una muestra de alimento, una muestra agrícola y una muestra veterinaria, en donde opcionalmente la muestra biológica se selecciona de entre el grupo que consiste en sangre, sangre completa, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aliento, orina, semen, saliva, líquido meníngeo, líquido amniótico, líquido glandular, líquido linfático, aspirado de pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, células, un extracto celular, heces, tejidos, un extracto tisular, una biopsia tisular y líquido cefalorraquídeo, preferentemente plasma o suero.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicho primer marcador y dicho segundo marcador, dicho primer elemento de captura y dicho segundo elemento de captura comprenden cada uno al menos un componente que se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico cerrado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, un ligando, un lípido, biotina, avidina, estreptavidina, Extravidina, neutravidina, Traptavidina, un metal, histidina y cualquier parte de cualquiera de estas estructuras.
17. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, comprendiendo el primer marcador un resto liberable, preferentemente en donde el resto liberable comprende un resto fotoescindible.
18. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dichos primer soporte sólido y segundo soporte sólido se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo que consiste en una perla de polímero, una perla de agarosa, una perla de poliestireno, una perla de acrilamida, una perla de núcleo sólido, una perla porosa, una perla paramagnética, una perla de cristal, una perla de poro controlado, un pozo de microtitulación, un sustrato de copolímero ciclo-olefina, una membrana, un sustrato plástico, nailon, una película de Langmuir-Blodgett, cristal, un sustrato de germanio, un sustrato de silicio, un chip de placa de silicio, un chip de flujo, una microperla, una nanopartícula, un sustrato de politetrafluoroetileno, un sustrato de poliestireno, un sustrato de arsenuro de galio, un sustrato de oro y un sustrato de plata.
19. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que comprende además cuantificar dicha diana cuantificando dicho aptámero.

20. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde la detección del aptámero comprende la hibridación del aptámero con un tercer soporte sólido, comprendiendo el tercer soporte sólido una pluralidad de características dirigibles y comprendiendo al menos una de dichas características al menos un elemento de captura dispuesto sobre él, que es complementario de cualquier secuencia contenida en el aptámero y/o que comprende además la etapa de detección de dicha molécula diana detectando la parte de aptámero de dicho complejo de afinidad aptámero-diana.
- 5

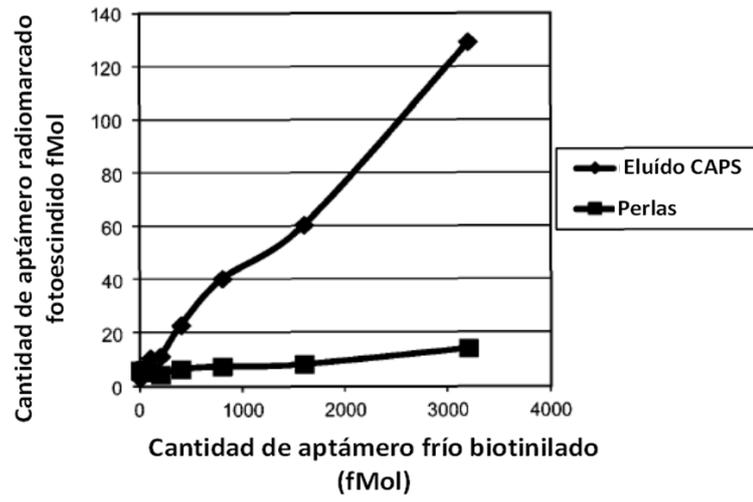


FIG. 1

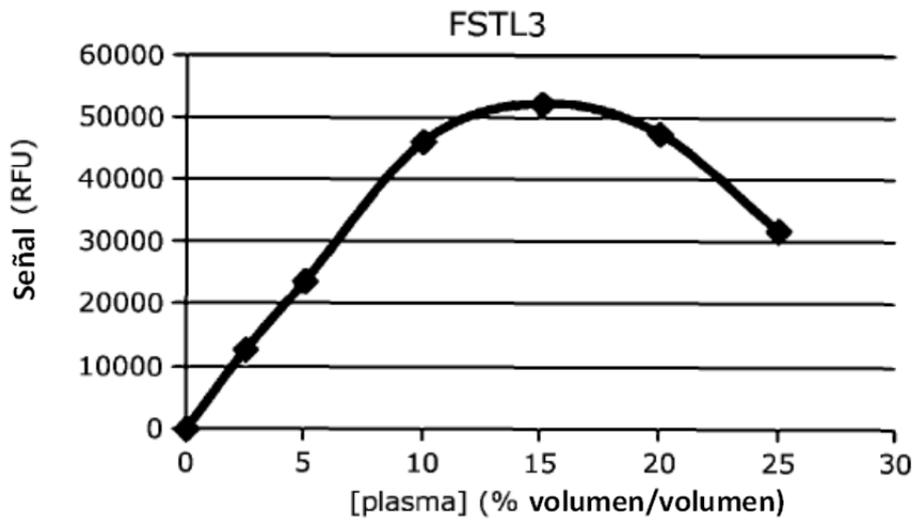


FIG. 2A

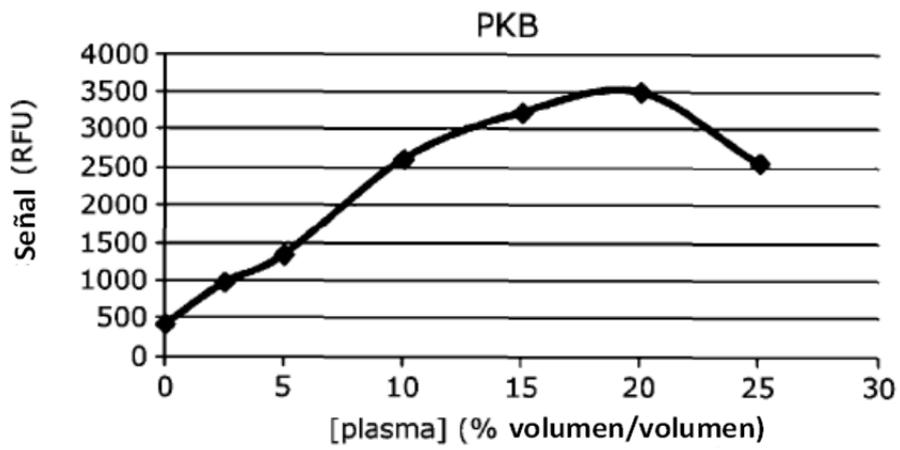


FIG. 2B

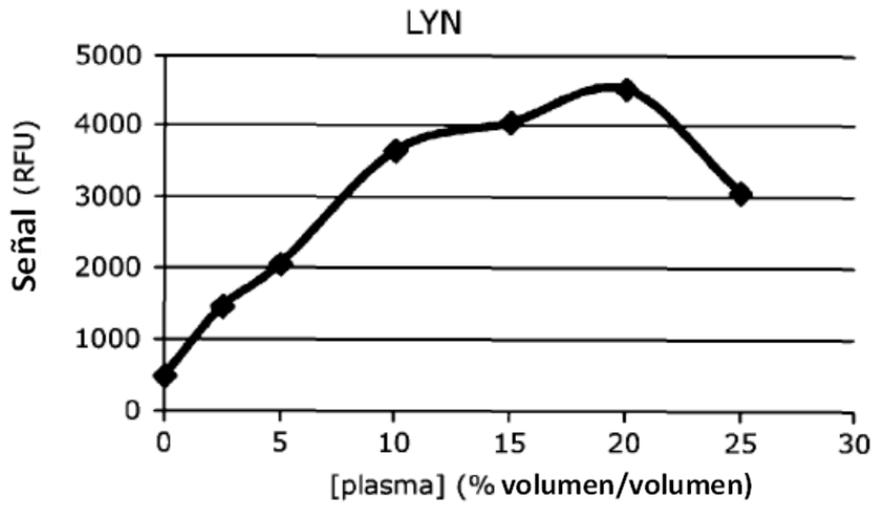


FIG. 2C

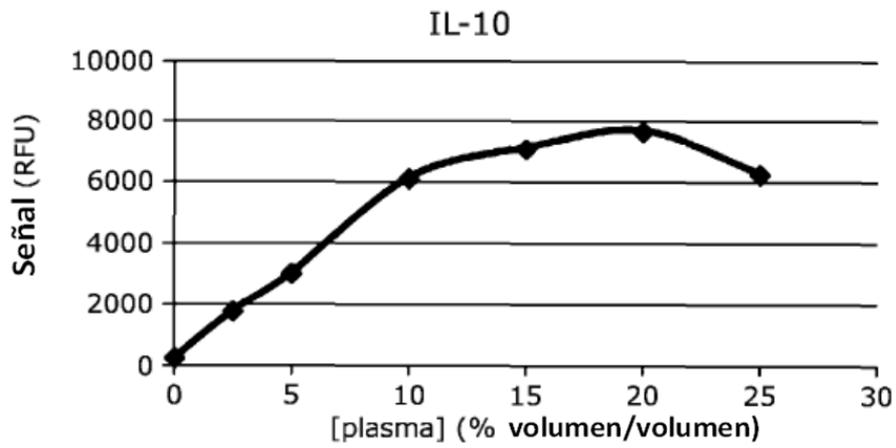


FIG. 2D

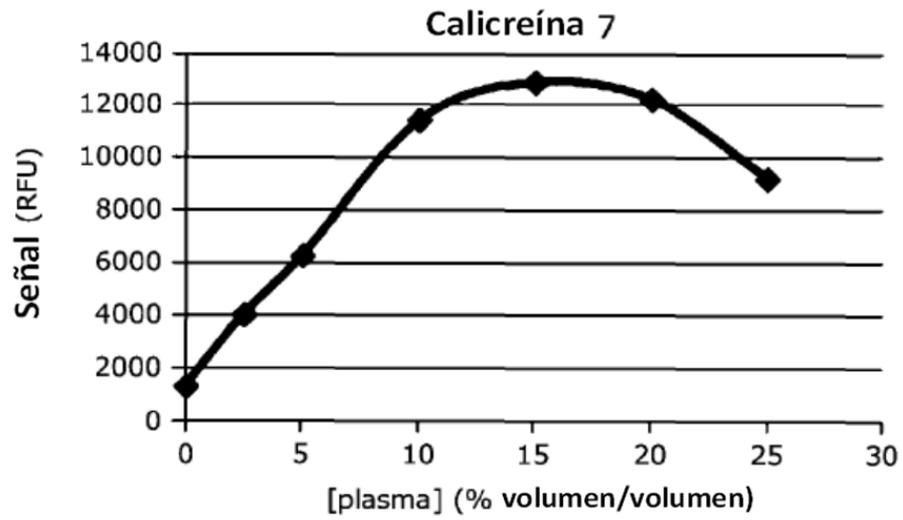


FIG. 2E

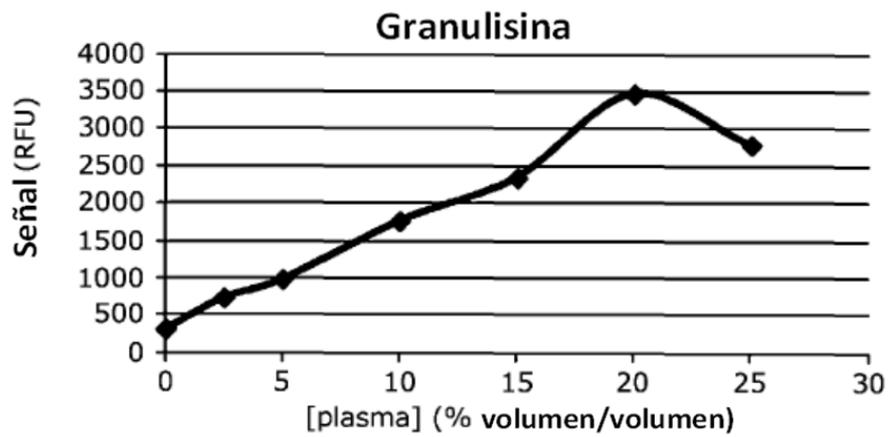


FIG. 2F

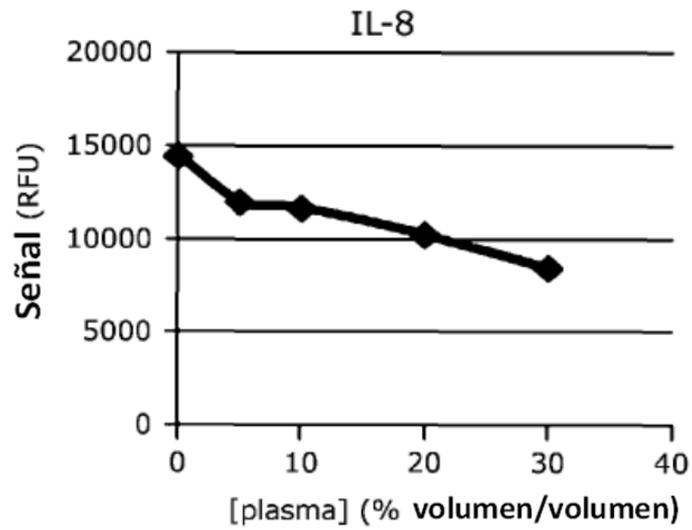


FIG. 3A

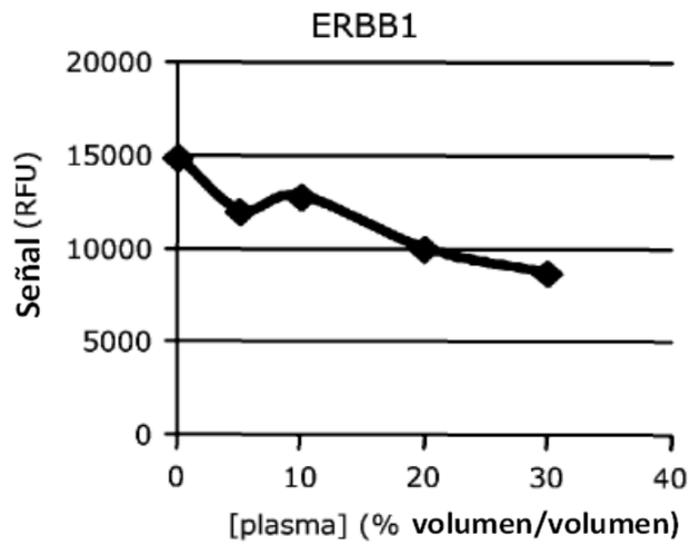


FIG. 3B

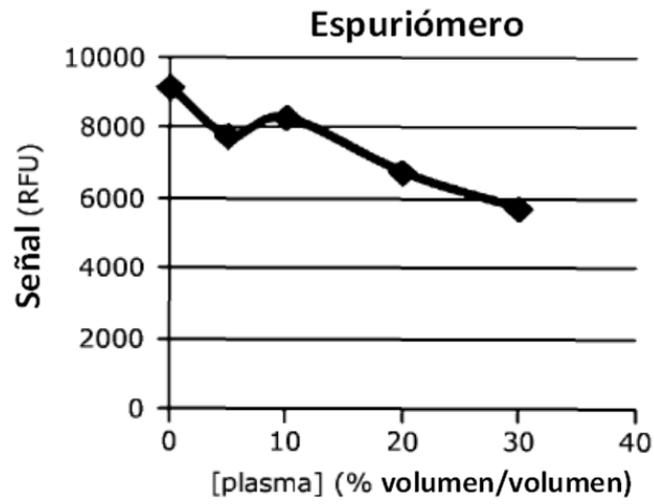


FIG. 3C

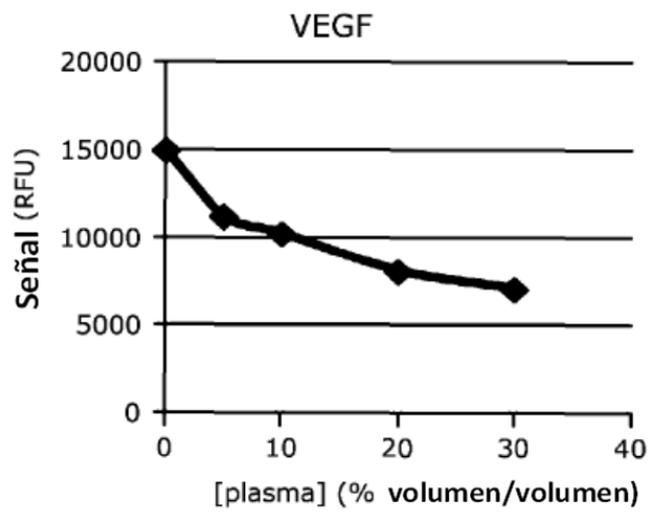


FIG. 3D

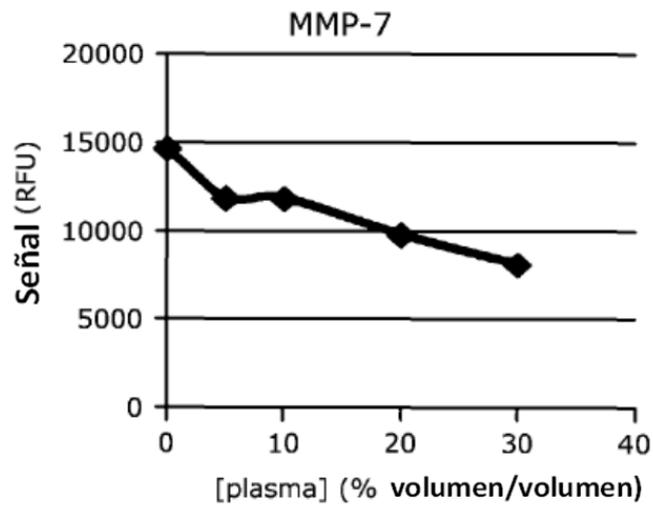


FIG. 3E

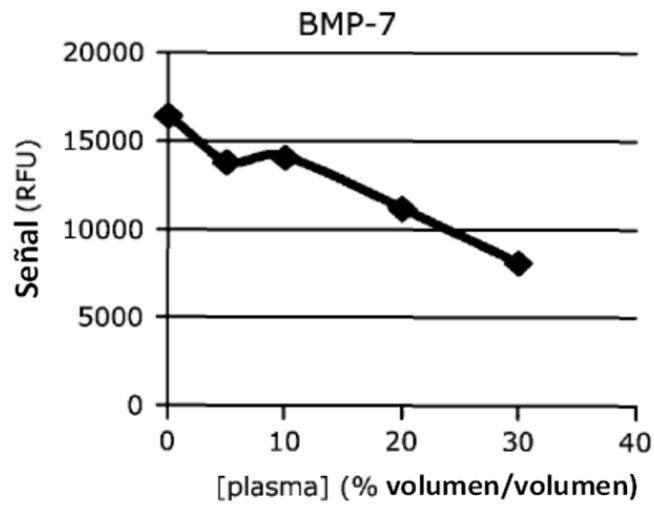


FIG. 3F

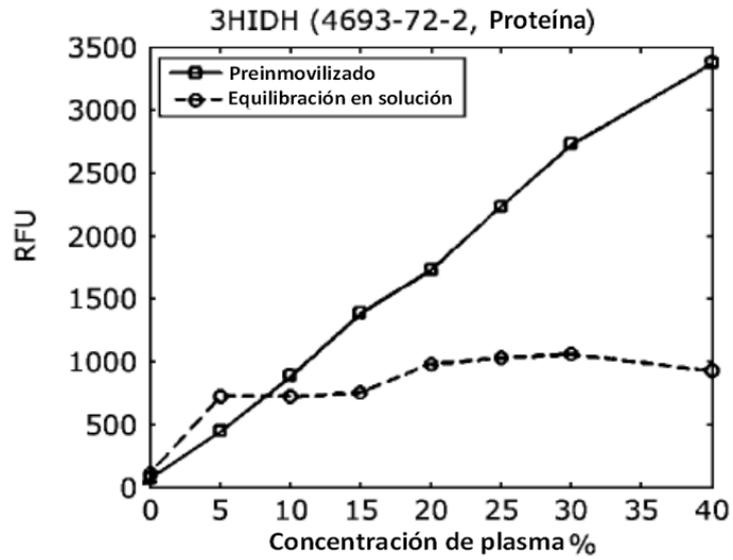


FIG. 4A

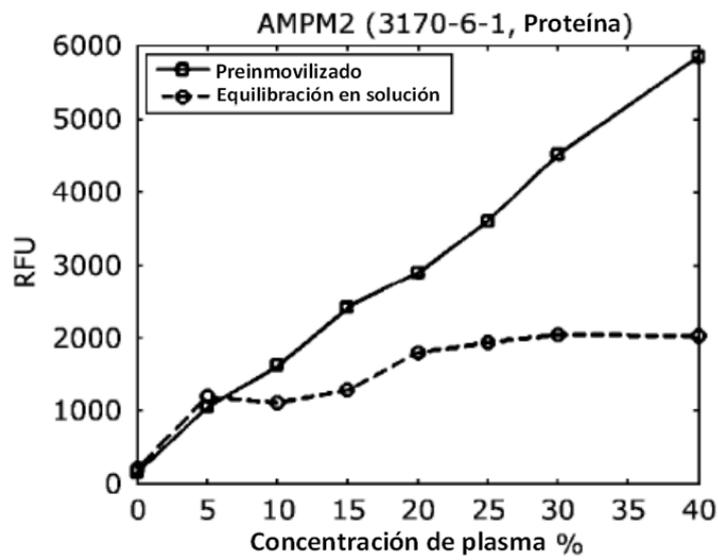


FIG. 4B

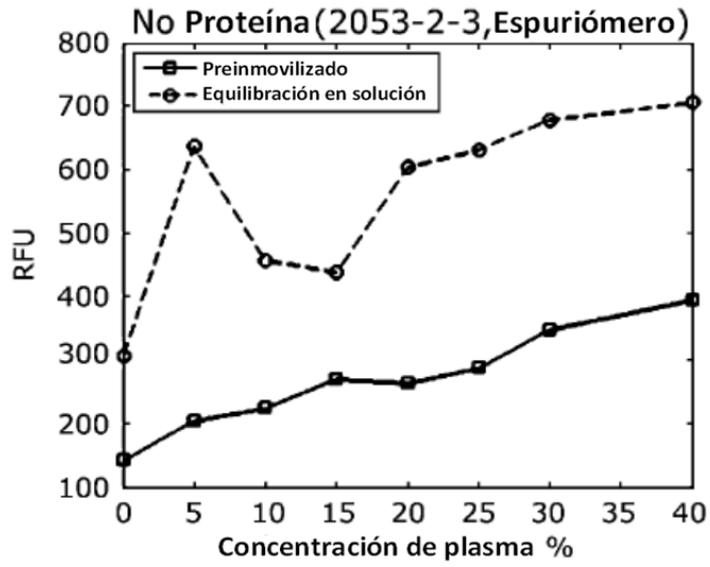


FIG. 4C

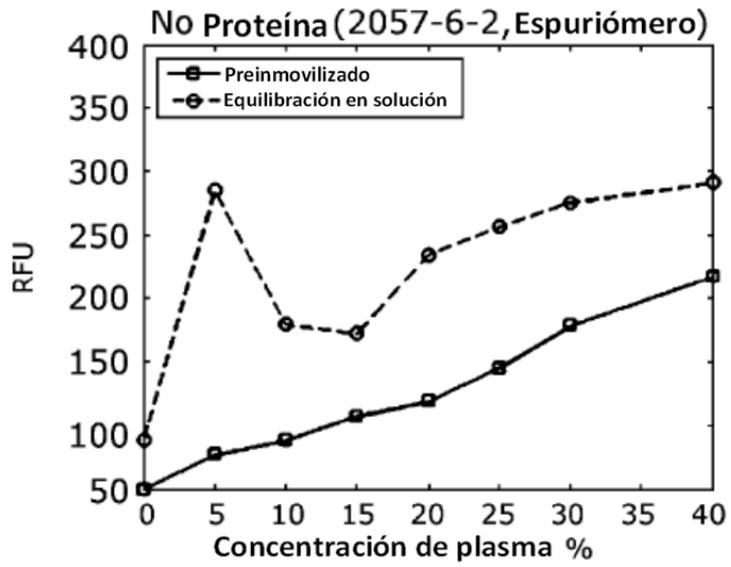


FIG. 4D

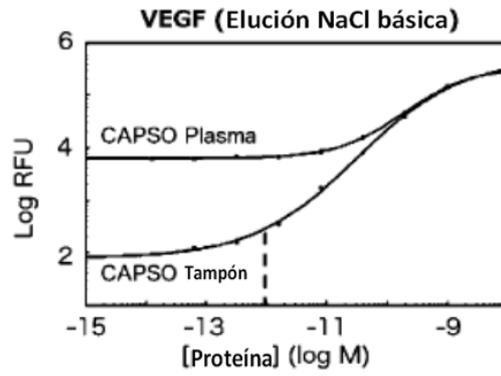


FIG. 5A

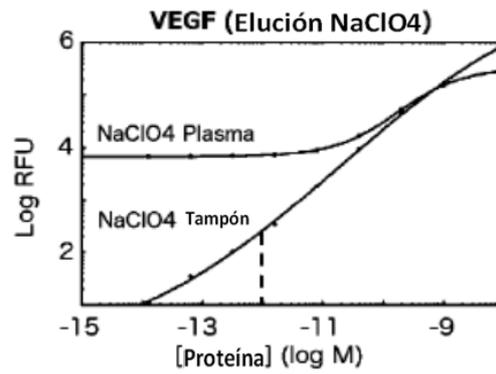


FIG. 5B

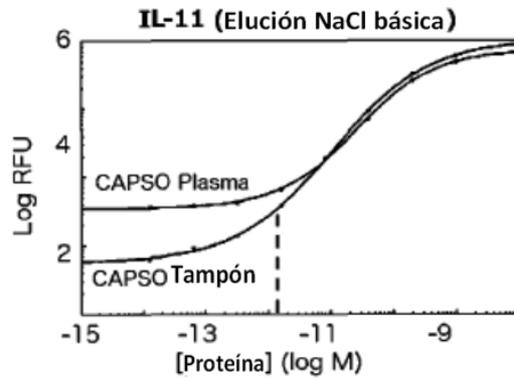


FIG. 5C

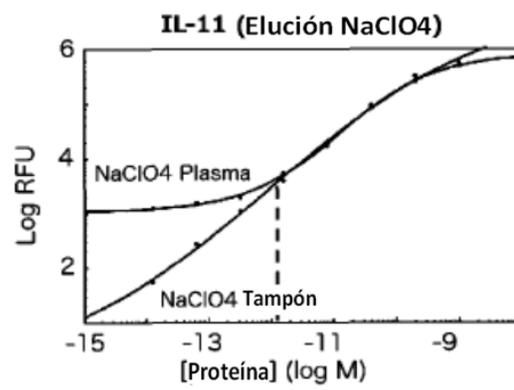
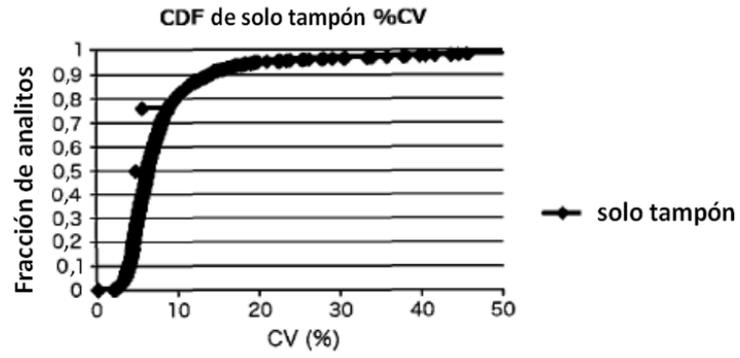
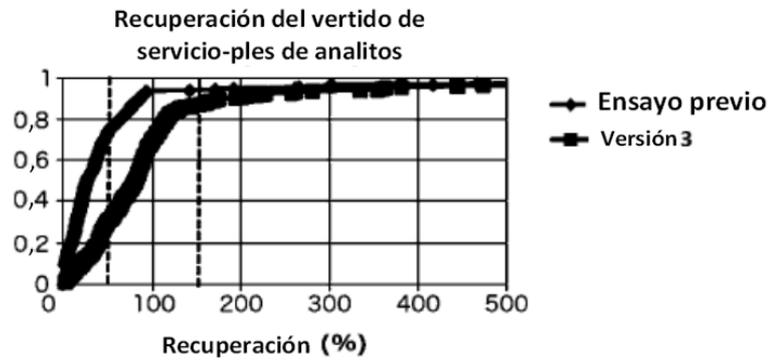


FIG. 5D



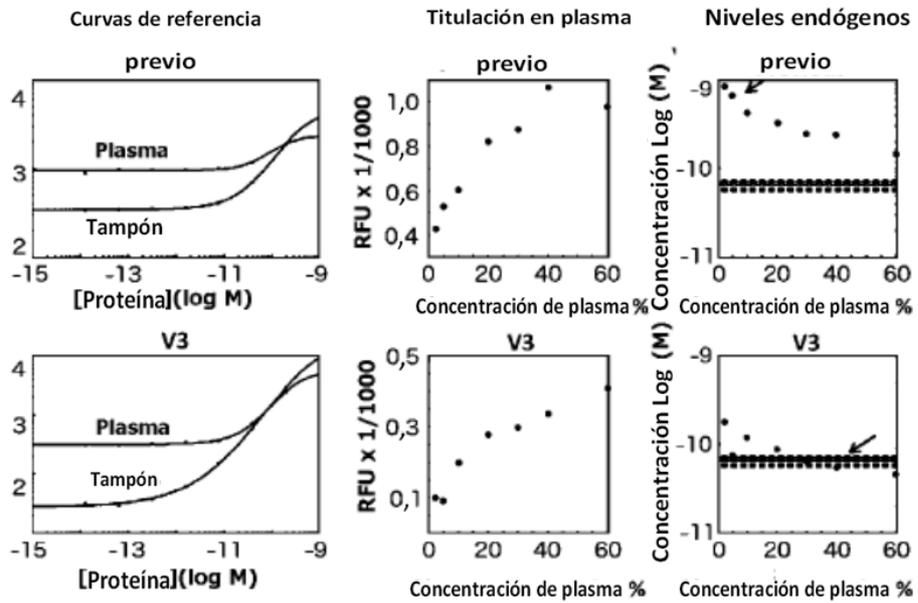
Mediana de señal	32
Media de señal	45
Mediana de CV (todos los analitos)	6,2%
Media de CV (todos los analitos)	8,6%

FIG. 6



	Ensayo previo	Versión 3
Mediana	25%	79,9%
Entre un 50% y un 150%	48	138

FIG. 7



ERBB2

FIG. 8

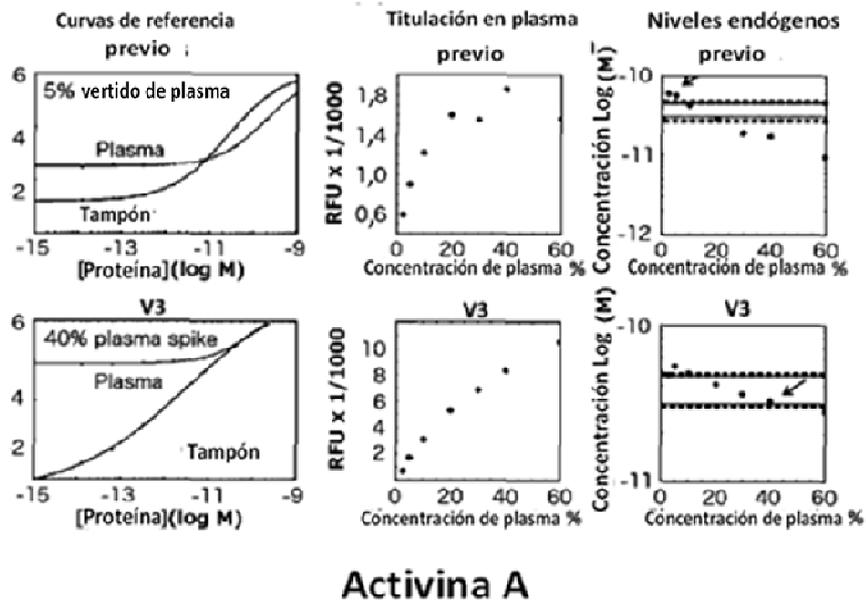


FIG. 9