

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 734**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6811 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2012 PCT/EP2012/071155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13060777**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012 E 12780712 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2771485**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de aptámeros**

30 Prioridad:

28.10.2011 DE 102011085473

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

28.11.2018

73 Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(100.0%)
Fahnenbergplatz
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**ROTH, GÜNTHER;
REINEMANN, CHRISTINE y
STREHLITZ, BEATE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 691 734 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

Procedimiento para la identificación de aptámeros

La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de aptámeros. Los aptámeros son oligonucleótidos artificiales que se seleccionaron a partir de una biblioteca de oligonucleótidos respecto a sus propiedades de enlace frente a una estructura objetivo deseada, también denominada objetivo. El desarrollo de aptámeros de ADN se efectúa hasta la fecha según un procedimiento de selección in vitro, seleccionándose a partir de una biblioteca compleja de aproximadamente 10^{15} moléculas diferentes aquellas con las mejores propiedades de enlace con el objetivo. El método se llama SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), y las bases para el mismo se describieron en 1990 (Ellington, A. D., Szostak, J. W., Nature 346 (1990) 818-822, Tuerk, C., Gold, L., Science 249 (1990) 505-510, Robertson, D. L., Joyce, G. F., Nature 344 (1990) 467-468). El proceso SELEX se aplica en muchas variaciones para la selección de aptámeros (Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., Biomol. Eng. 24 (2007) 381-403)).

El proceso SELEX para la obtención de aptámeros de ADN es un proceso iterativo. El punto de partida es una biblioteca de ADN sintetizado químicamente con aproximadamente 10^{15} secuencias diferentes. Las moléculas de ADN aisladas de la biblioteca disponen en este caso de un intervalo de secuencias randomizado, por ejemplo de 20 a 80 nucleótidos de longitud, flanqueado por secuencias de cebador específicas en cada caso en el extremo 3' y 5', a modo de ejemplo de 18 a 21 nucleótidos de longitud, que son iguales en cada elemento de la biblioteca. Un ciclo de proceso, que se denomina también ronda (de selección), está constituido por los pasos:

- Enlace con el objetivo,
- Eliminación de ADN no enlazado,
- Elución de ADN enlazado del objetivo,
- Amplificación del ADN enlazado previamente por medio de PCR,
- Así como obtención del ssADN relevante de los productos de PCR.

El resultado de la ronda previa es respectivamente el material de partida para la siguiente ronda. Después de aproximadamente 6 a 20 horas se debían haber concentrado motivos de secuencia con alta afinidad y especificidad para el objetivo. Las fuerzas impulsoras de este proceso evolutivo son las condiciones de selección, que se determinan a través de las propiedades del objetivo, su concentración, las condiciones de tamponado de la disolución, temperatura, tiempo de incubación, eficiencia de la separación de ADN no enlazado, introducción de pasos de selección negativos, entre otros. En este caso, la afinidad y la especificidad de aptámeros depende de la estringencia de las condiciones, que se puede adaptar en el transcurso de las rondas de selección. La funcionalidad de aptámeros, es decir, su capacidad de enlace con el objetivo, se fundamenta mediante su estructura tridimensional, que depende de su secuencia primaria, de la longitud de las moléculas de ácido nucleico (preferentemente < 100 nucleótidos), y de las condiciones ambientales. Los aptámeros forman motivos estructurales típicos, como tallos, bucles internos, tetrabuques, triplicados, pseudonudos, estructuras de horquilla, complejos de beso o estructuras G-cuádruplex. En presencia del objetivo, los aptámeros están sujetos a modificaciones de conformación adaptativas, de modo que su plegamiento tridimensional forma un punto de enlace específico para el objetivo (ajuste inducido). El enlace entre aptámero y objetivo se basa en diferentes interacciones intermoleculares, como compatibilidad estructural, apilamiento de anillos aromáticos con las bases de ácido nucleico de los aptámeros, interacciones electrostáticas entre grupos cargados y enlaces por puentes de hidrógeno.

Se desarrollaron aptámeros para objetivos muy diferentes: moléculas inorgánicas y reducidas, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, antibióticos. También se emplearon objetivos completos, como células y organismos completos, así como mezclas objetivo, para la selección de aptámeros. También se pueden emplear objetivos tóxicos y no inmunógenos, que no son accesibles, a modo de ejemplo, a una producción de anticuerpos. Tras su selección y análisis secuencial se efectúa la producción de aptámeros por medio de síntesis química, asegurándose la reproducibilidad, y no estando la cantidad limitada en principio. Las modificaciones de aptámeros son fáciles de realizar, por ejemplo para la inmovilización sobre superficies de sensor o chip, para la cuantificación o para la mejora de la estabilidad. El enlace de aptámero es reversible, y los aptámeros desnaturalizados son regenerables. Ambas características son grandes ventajas para la aplicación analítica de aptámeros. Los aptámeros muestran una gran similitud con anticuerpos respecto al comportamiento de enlace. Muchas de sus propiedades hacen de los aptámeros alternativas serias, o incluso superiores, a anticuerpos. Esto radica principalmente en la desnaturalización reversible, que justifica la almacenabilidad claramente mejor y la estabilidad química superior.

Además del procedimiento SELEX son conocidos otros dos procedimientos para la selección de aptámeros. El procedimiento Monolex de la firma Aptares parte igualmente de una biblioteca de oligonucleótidos. Tras una adsorción por afinidad de la biblioteca de oligonucleótidos se efectúa una clasificación por afinidad de oligonucleótidos en un lecho de adsorción y una separación de oligonucleótidos de diferente afinidad en diferentes reservas. Estas reservas se amplifican respectivamente, y se presentan entonces reservas de aptámeros policlonales de afinidad determinada en cada caso. Para la obtención de aptámeros aislados (monoclonales) se clona y se secuencia la respectiva reserva de aptámeros policlonales (<http://www.aptares.net/html/technologie.html>).

La firma NOXXON emplea un procedimiento para la producción de especulómeros para el desarrollo de aptámeros de ARN como productos farmacéuticos. Con este procedimiento se desarrollan ligandos de ARN, los denominados especulómeros, que contienen L-ribosa en lugar de D-ribosa como componente sacárico. La incorporación de L-ribosa en el esqueleto de azúcar-fosfato del ácido nucleico provoca que la estructura tridimensional de un L-ARN se comporte como imagen especular respecto a la estructura de su D-ARN correspondiente. Las moléculas de L-ARN están protegidas contra la disociación enzimática debida a nucleasas, y de este modo son claramente más estables que el correspondiente D-ARN. En primer lugar se seleccionan ligandos para el enantiómero de la verdadera estructura objetivo bajo empleo de la evolución in vitro. Si estos ligandos se han hallado, clonado, secuenciado y caracterizado, se sintetiza el correspondiente ácido L-ribonucleico, el especulómero, por vía química. A continuación, mediante determinación de las propiedades de enlace del ligando frente a su verdadera molécula objetivo, y también frente a su enantiómero, se pueden sacar conclusiones sobre la afinidad y la especificidad del especulómero. El documento WO 2009/151688 da a conocer la producción de una mezcla de aptámeros especial y procedimientos para utilizar esta mezcla de aptámeros para la selección de buenos enlazantes. En este procedimiento, la mezcla de aptámeros para el paso de selección está unida a un microchip. Como se ha mencionado anteriormente, en un proceso SELEX se debían haber concentrado motivos de secuencia con alta afinidad y especificidad para el objetivo después de aproximadamente 6 a 20 rondas. A continuación, los oligonucleótidos enlazantes de la reserva de oligonucleótidos concentrada se clonan y se transforman para el aislamiento, por ejemplo en E. coli. Después siguen otros pasos, como la determinación de transformantes positivos respecto a la exactitud del ADN de plásmido (pADN) y del inserto incorporado (producto de PCR) y a la preparación de pADN. En este procedimiento son desfavorables el gasto de tiempo relativamente elevado para recorrer hasta 20 rondas de SELEX y los extensos trabajos a continuación del proceso SELEX. Si durante una de las hasta 20 rondas de SELEX se eligieran las condiciones de selección de modo desfavorable, se podrían perder buenos enlazantes. Tras una clonación, en el procedimiento anterior la selección de los aptámeros a caracterizar ulteriormente se efectúa de manera accidental, de modo que también se pueden perder algunos buenos enlazantes, ya que éstos no se seleccionan casualmente, no se caracterizan adicionalmente y, por lo tanto, no se identifican como aptámeros. Una tarea de la presente invención consistía en poner a disposición un procedimiento que no presentara estos inconvenientes.

Esta tarea se soluciona mediante un procedimiento para la identificación y/u obtención de aptámeros, que comprende

- La puesta en contacto de una mezcla de oligonucleótidos con una estructura objetivo de aptámero, y el enlace de al menos una parte de los oligonucleótidos a la estructura objetivo,
- La separación de oligonucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero, de la estructura objetivo de aptámero y de oligonucleótidos no unidos a la estructura objetivo de aptámero,
- La amplificación separada espacialmente de todos los nucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero, y la generación de amplificadores separados espacialmente para cada oligonucleótido, conteniendo cada amplificado predominantemente una clase de oligonucleótidos,
- La asignación de una identificación de emplazamiento específica en cada amplificado separado espacialmente, de modo que cada uno de los amplificadores caracterizados es identificable claramente por medio de su identificación de emplazamiento específica,
- La secuenciación de oligonucleótidos de los amplificadores caracterizados y la asignación de la identificación de emplazamiento específica para el amplificado respecto a la secuencia de la clase de oligonucleótidos en el amplificado,
- Producción de un conjunto de amplificadores, aplicándose los oligonucleótidos amplificadores al menos en un primer soporte, de modo que el conjunto comprende puntos aislados con secuencias uniformes para cada oligonucleótido seleccionado,
- El análisis de las propiedades de enlace de todas las clases de oligonucleótidos asignados a los amplificadores en el ensayo en la estructura objetivo de aptámero, y la asignación de las propiedades de enlace analizadas a las identificaciones de emplazamiento específicas de los amplificadores y las secuencias de las correspondientes clases de oligonucleótidos, poniéndose en contacto el conjunto de amplificadores con la estructura objetivo de aptámero para el análisis de las propiedades de enlace.

Este procedimiento para la identificación/obtención de aptámeros transcurre con velocidad sensiblemente mayor que el proceso SELEX. Ya no es necesario llevar a cabo varias rondas de proceso, sino que ya es suficiente una selección simple. Los extensos trabajos a continuación de SELEX, la clonación para el aislamiento de oligonucleótidos enlazantes de la reserva concentrada, se suprimen. Tras la clonación, en el procedimiento convencional la selección de los aptámeros a caracterizar ulteriormente se efectúa de manera accidental, de modo que se pueden "perder" buenos enlazantes individuales, ya que éstos no se seleccionan casualmente, ya no se caracterizan y no se identifican como aptámeros. Por el contrario, en el nuevo proceso aquí descrito se aíslan, se secuencian y se analizan todos los oligonucleótidos enlazados de modo muy similar. Los aptámeros se seleccionan como enlazantes con las máximas afinidades al final del proceso en base a las afinidades medidas. Por consiguiente, debido a su estructura, el nuevo método alcanza un rendimiento elevado y permite una mejor valoración de los aptámeros obtenidos.

Con el procedimiento es posible identificar aptámeros en un tiempo menor y determinar simultáneamente su

secuencia y su constante de enlace con el objetivo dentro del proceso. En este caso, el procedimiento ofrece todas las ventajas del procedimiento SELEX. No obstante, ya después de un primer paso de selección (enlace, eliminación de no enlazantes, elución de enlazantes del objetivo), que se puede llevar a cabo según los pasos de un procedimiento SELEX conocido, en este caso existe la posibilidad de concluir el proceso e identificar aptámeros enlazantes. Mediante el empleo opcional de otro paso de enlace y selección para la valoración, aún durante la preparación de la secuenciación se da además la posibilidad de una especificidad claramente más elevada que en el caso de SELEX.

Otras ventajas que se pueden obtener con la invención y/o con formas de realización especiales descritas a continuación son:

- 10 - La posibilidad de secuenciación paralela e investigación de las propiedades de enlace de un número muy elevado de aptámeros potenciales. La secuenciación por medio de variantes descritas a continuación permite el análisis secuencial paralelo de hasta 10^6 oligonucleótidos. En un paso único se pueden seleccionar, analizar y validar hasta 10^6 oligonucleótidos, de modo que al final se puede encontrar un grupo de aptámeros mediante comparación de afinidad en el caso de incubación con el objetivo.
- 15 - En el caso de amplificación separada espacialmente, como se emplea en este caso, cada oligonucleótido se amplifica por separado. En la amplificación previa, los oligonucleótidos compiten entre sí también en la amplificación, de modo que se pueden perder oligonucleótidos con mala eficiencia de amplificación, independientemente de sus calidades de enlace.

En principio se considera que los pasos de procedimiento enumerados no tienen que tener lugar forzosamente en el orden indicado anteriormente. Si es razonable y posible técnicamente, se puede variar el orden. Los pasos se pueden variar en especial en el orden que tiene lugar tras los pasos a) puesta en contacto de una mezcla de oligonucleótidos con una estructura objetivo de aptámero predeterminada, y b) la unión de al menos una parte de los oligonucleótidos a la estructura objetivo, y la separación de oligonucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero. A modo de ejemplo, la amplificación separada espacialmente, la asignación a una identificación específica, la secuenciación y el análisis de las propiedades de enlace de la estructura objetivo de aptámero pueden tener lugar en diferentes órdenes temporales, o varios de estos pasos pueden tener lugar simultáneamente, como se evidencia a partir de las siguientes explicaciones y los siguientes ejemplos de realización.

Los pasos enumerados anteriormente se explican solo en particular.

El concepto "aptámeros" designa oligómeros de ácido nucleico de hebra simple, que se pueden unir específicamente a una estructura objetivo o a una molécula objetivo, también denominada objetivo, a modo de ejemplo a una proteína, a compuestos de bajo peso molecular, como sustancias orgánicas, aminoácidos y antibióticos, ácidos nucleicos, partículas víricas o (micro)organismos, así como otros objetivos citados de modo preliminar. El enlace de aptámero-objetivo se efectúa como se cita de modo preliminar.

Como sustancia de partida se emplea una mezcla de oligonucleótidos en el procedimiento. El concepto "mezcla" designa una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias.

Los oligonucleótidos presentan preferentemente una o varias zonas variables, preferentemente zonas internas variables. Además pueden estar presentes regiones de cebador, preferentemente en el extremo 5' y 3' de los oligonucleótidos. Una zona variable interna, de las que pueden estar presentes una o varias, es, a modo de ejemplo, una zona secuencial randomizada, en especial una zona que es o presenta una secuencia accidental combinatoria. Una zona variable interna tiene, a modo de ejemplo, una longitud de 10-80, preferentemente 20-80, de modo aún más preferente 40-80 nucleótidos, indicándose estas longitudes solo de manera ejemplar y no representando éstas una limitación. Entre dos zonas variables puede estar dispuesta una zona con una secuencia determinada. Un ejemplo no limitante a tal efecto es una secuencia capturadora, que se explica aún a continuación.

Las regiones de cebador sirven como puntos de enlace de cebador para una amplificación, preferentemente una amplificación de PCR. Alternativamente o de manera adicional, los cebadores pueden servir para el enlace de los oligonucleótidos a una fase sólida, a modo de ejemplo placas, perlas, chips u otros soportes, como se describen aún a continuación. Además, a través del cebador se pueden introducir modificaciones adicionales, como moléculas fluorescentes, marcadores de biotina, enzimas, etc, durante o tras el procedimiento.

La sustancia de partida, es decir, la mezcla de partida de oligonucleótidos, se denomina también biblioteca de partida, biblioteca de oligonucleótidos, biblioteca o biblioteca aleatoria combinatoria. Los oligonucleótidos con la estructura descrita anteriormente se pueden adquirir de proveedores comerciales. La variabilidad de una biblioteca se sitúa, a modo de ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 10^{15} moléculas diferentes.

En el caso de los oligonucleótidos se puede tratar de ADN de hebra simple (ssADN), RNA, ssADN modificado o ARN modificado o moléculas sintéticas análogas a ácidos nucleicos (por ejemplo APN). En el transcurso del procedimiento, en pasos de procedimiento separados, en especial en pasos de amplificación, se presentan contrahebras complementarias a los oligonucleótidos. Una vez concluida la amplificación, en los amplificados están contenidos los oligonucleótidos y sus contrahebras complementarias, a partir de los cuales se obtiene el ssADN deseado para investigaciones posteriores respecto al enlace con el objetivo. Para la investigación del enlace con el objetivo se analizan las hebras separadas de oligonucleótido, en especial ssADN.

El procedimiento también es apropiado en especial para la aplicación para ácidos nucleicos naturales y artificiales, en especial para especlómeros, moléculas sintéticas análogas a ADN (APN), etc. El principio de los especlómeros se explicó al inicio.

La puesta en contacto de los oligonucleótidos con la estructura objetivo de aptámero, el enlace de al menos una parte de los oligonucleótidos con la estructura objetivo y la separación de los oligonucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero, de la estructura objetivo de aptámero y de oligonucleótidos no unidos a la estructura objetivo de aptámero, se puede efectuar de cualquier modo, en especial como se sabe ya por los procesos SELEX del estado de la técnica. A continuación se enumeran algunos procedimientos de manera ejemplar, sin que esto limite el procedimiento de ningún modo.

A modo de ejemplo, el objetivo puede estar unido a una fase sólida y se puede poner en contacto con oligonucleótidos liberados, uniéndose al objetivo una parte de oligonucleótidos, los aptámeros potenciales. La fase sólida puede presentar propiedades que permiten una fácil separación de la fase líquida con oligonucleótidos no unidos al objetivo. A modo de ejemplo, la fase sólida puede ser magnética, a modo de ejemplo en forma de partículas magnéticas (perlas magnéticas). Con un paso de elución, como se conoce ya por procedimientos SELEX, los oligonucleótidos unidos al objetivo se pueden eluir de la fase sólida y del objetivo.

En otra variante, una denominada secuencia de captura está unida a una fase sólida, preferentemente en forma de partículas magnéticas. Un enlace de oligonucleótidos de hebra simple de la biblioteca de partida con la fase sólida se efectúa a través de la secuencia de captura (capture sequence). La secuencia de captura es complementaria a una zona dentro de los oligonucleótidos de hebra simple de la biblioteca de partida. Con ayuda de la secuencia de captura tiene lugar un enlace reversible entre capturador y oligonucleótidos. El objetivo se presenta libre en disolución y se encuentra disponible para un enlace con los oligonucleótidos, los aptámeros potenciales. Los oligonucleótidos específicos para el objetivo se acoplan mediante formación de una estructura bi- o tridimensional definida de la secuencia capturadora, y se pueden encontrar en disolución junto con el objetivo. La fase sólida, a la que permanecen unidos los oligonucleótidos específicos para el objetivo se puede separar junto con estos oligonucleótidos.

Otras variantes son métodos de enlace que se emplean en las diferentes modificaciones de procesos SELEX, por ejemplo el enlace entre células completas y la biblioteca de oligonucleótidos, a continuación separación de los no enlazantes por medio de centrifugado y elución de enlazantes por medio de calor. Se incluye una sinopsis de procedimientos SELEX en Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. (2007) SELEX - a (r)evolutionary method to generate high affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* 24, 381-403.

Si el objetivo está unido a una fase sólida, antes de los pasos de procedimiento descritos anteriormente se puede efectuar una selección negativa para la fase sólida, es decir, una selección contra la fase sólida sin objetivo enlazado.

Antes de los pasos de procedimiento descritos anteriormente se puede efectuar también una selección con otras moléculas inespecíficas. Asimismo se pueden llevar a cabo selecciones complementarias con moléculas objetivo análogas pero indeseables, para empobrecer en enlazantes correspondientes antes de la selección a partir de la biblioteca de oligonucleótidos.

45 Amplificación separada espacialmente

El concepto "amplificación separada espacialmente de todos los oligonucleótidos" tiene el siguiente significado: un oligonucleótido aislado es un oligonucleótido con una determinada secuencia. Todos los oligonucleótidos se amplifican de modo que cada oligonucleótido aislado se amplifica por separado espacialmente de los demás, y el amplificado obtenido permanece asimismo separado espacialmente de todos los demás amplificados. De este modo no tiene lugar un entremezclado de los amplificados aislados.

En este caso, un amplificado comprende una pluralidad de oligonucleótidos, que se obtienen mediante la amplificación de un oligonucleótido aislado con una determinada secuencia. Cada amplificado contiene

predominantemente, y según medios de amplificación y condiciones, principalmente o casi de manera exclusiva, o exclusivamente, una serie de oligonucleótidos con una secuencia que coincide con la secuencia del oligonucleótido aislado empleado como molécula de partida (matriz). Por consiguiente, el concepto "clase" se refiere a la secuencia de un oligonucleótido. Una clase está caracterizada por una secuencia determinada. El amplificado contiene 5
 10
 15
 Para la amplificación separada espacialmente se puede aplicar cualquier procedimiento de amplificación conocido, siendo preferente la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

La amplificación separada espacialmente tiene lugar en especial en zonas limitadas espacialmente, que pueden estar completamente cerradas o no. Tales zonas limitadas se pueden generar en especial mediante límites de fases, como por ejemplo estructuras de cuerpo sólido y líquidos, o límites de fase líquido-líquido o fases líquidas-gaseosas. 20
 Son ejemplos de cavidades limitadas espacialmente delimitaciones locales que facilitan la difusión en determinadas direcciones y dificultan la misma en otras direcciones, como por ejemplo una disposición de columnas o surcos, estructuras porosas o estructuras moleculares que prefieren, o bien limitan una difusión en determinados sentidos, como por ejemplo hidrogeles, aerogeles o superficies poliméricas. También son posibles nanoestructuras o 25
 estructuras moleculares ordenadas o desordenadas, como ramas poliméricas, dendrímeros, conjuntos de partículas, membranas filtrantes, membranas lipídicas (esféricas o planas), para implementar zonas limitadas espacialmente. Del mismo modo, mediante fuerzas y campos, o una combinación de límites de fases y campos/fuerzas, se pueden crear correspondientes zonas separadas espacialmente, como por ejemplo campos eléctricos que limitan la difusión en una zona o mantienen unido el ADN a la superficie.

En formas de realización especiales, la amplificación separada espacialmente es una amplificación en una emulsión, una amplificación digital, una amplificación en una cavidad o una amplificación en una fase sólida, en especial una 30
 PCR en emulsión, una PCR digital o una PCR en fase sólida.

Por el estado de la técnica son conocidos procedimientos para la amplificación en una fase sólida (amplificación en fase sólida). En este caso se obtienen amplificados de distribución casual en una superficie de fase sólida, a modo de ejemplo una superficie plana. A través de secuencias de enlace apropiadas, mediante apareamiento de bases, 35
 los oligonucleótidos pueden estar unidos a secuencias complementarias, que están enlazadas a la superficie de fase sólida. Las secuencias complementarias son en especial secuencias de cebador para una PCR. Los cebadores directos e inversos están unidos preferentemente a la superficie de fase sólida a través de enlace covalente para la amplificación de oligonucleótidos. Se añaden los medios de amplificación requeridos para la PCR. La proporción de 40
 cebadores respecto a plantillas, así como el tiempo de PCR, determinan la densidad de amplificados obtenida en la superficie de fase sólida. Con tal procedimiento se obtienen en consecuencia amplificados separados espacialmente en la superficie de fase sólida. Como fase sólida se emplean frecuentemente placas de vidrio. Se describen amplificaciones de fase sólida en L. Metzker et al., Nature Reviews, Genetics, Vol. 11, 2010, 31-46, y la literatura aquí citada sobre amplificaciones en fase sólida, como por ejemplo M. Fedurco et al., Nucleic Acids Res. 34, e22 (2006).

Una variante conocida de la amplificación en fase sólida es la denominada "amplificación puente", que se ofrece, a modo de ejemplo, por la firma Illumina en su secuenciador SOLEXA. En una superficie de fase sólida están unidos mediante enlace covalente cebadores directos e inversos para los oligonucleótidos a amplificar. Una vez efectuado el enlace con la superficie tiene lugar una amplificación de los oligonucleótidos. La nueva hebra complementaria generada de este modo está unida a la superficie mediante enlace covalente, y dispone de un punto de enlace 50
 adicional en su extremo no enlazado. Éste se puede unir ahora igualmente al cebador apropiado en la superficie e iniciar una amplificación ulterior, que genera por su parte una nueva hebra de oligonucleótido, que está enlazada en un extremo y posee la secuencia de enlace original en el otro extremo libre. De este modo se generan exponencialmente un número creciente de hebras que están unidas sólidamente en un extremo y cuyo extremo adicional permite un enlace provisional con la superficie. Durante la amplificación, una hebra está unida sólidamente 55
 a un extremo (mediante enlace covalente) y suelta en el otro extremo (mediante enlace no covalente), y genera de este modo un "arco" molecular, que se denomina puente. A este respecto, el documento US 6,300,070 describe generalmente la amplificación puente, y Abrams et al., Diagnostic and Gene Detection Ch. (1997) 171-189, describe el empleo de una amplificación puente para la secuenciación. Este procedimiento se puede ampliar en el sentido de

eliminar la contrahebra tras la reacción de amplificación y efectuar una secuenciación, y realizar una medición de enlace contra el objetivo tras la secuenciación.

Si para la amplificación en una fase sólida se emplean sistemas disponibles comercialmente, a los que están unidas determinadas secuencias de cebador, en el procedimiento según la invención se emplean preferentemente oligonucleótidos que son compatibles con estas secuencias de cebador, o bien presentan puntos de enlace compatibles con estos cebadores. Si éste no es el caso, se efectúa un paso de ligazón con los denominados adaptadores, que son compatibles con los cebadores en la fase sólida. Opcionalmente, los oligonucleótidos se pueden prolongar también en posición terminal por medio de una amplificación de modo correspondiente. No obstante, ésto podría influir sobre las características de enlace. Por lo tanto, es preferente que las secuencias flanqueantes de oligonucleótidos sean compatibles con las secuencias de cebador de los procesos de secuenciación comerciales.

La amplificación en emulsión es preferentemente una PCR en emulsión. Como base sirve preferentemente una emulsión de agua en aceite. Las gotitas de fase acuosa sirven como microreactor. Las concentraciones para esta emulsión de agua en aceite se seleccionan de modo que, en el caso ideal, en cada gotita de fase acuosa esté incluido exactamente un oligonucleótido en cada caso. Además, en la fase acuosa están contenidos los medios de amplificación necesarios, como imprimador y polimerasa, para la PCR. Una vez realizada una PCR se obtienen amplificados separados espacialmente, ya que las gotitas de fase acuosa se presentan separadas en la fase oleaginosa. Cada gotita de fase acuosa contienen predominantemente una clase de oligonucleótidos y contrahebras complementarias. Tal variante de PCR en emulsión se describe, a modo de ejemplo, en M. Nakano et al., *Journal of Biotechnology* 102 (2003) 117-124 und Williams et al., *Nature Methods*, Vol. 3, No. 7 (2006), 545-550.

En una forma de realización de la invención, los oligonucleótidos se unen a partículas de fase sólida antes de, durante o tras la amplificación separada espacialmente, obteniéndose partículas de fase sólida a las que está unido respectivamente solo un amplificado con una clase de oligonucleótidos. En este caso, el oligonucleótido amplificado o la contrahebra complementaria, o ambos, pueden estar unidos opcionalmente a una partícula mediante enlace covalente.

Esta forma de realización se puede combinar, a modo de ejemplo, con una variante de PCR en emulsión, en la que, además de un sistema bifásico, como agua en aceite, se emplean adicionalmente partículas de fase sólida. En esta variante de una PCR en emulsión, a través de secuencias de enlace apropiadas, los oligonucleótidos se unen a secuencias complementarias, que están unidas a la superficie de partículas de fase sólida. Los oligonucleótidos se mezclan en fase acuosa junto con medios de amplificación de PCR y partículas de fase sólida, que también se denominan perlas, y se emulsionan en aceite, de modo que se produce una emulsión de agua y partículas en aceite. Para esta emulsión de agua en aceite, las concentraciones se seleccionan de modo que, en el caso ideal, en cada gotita de agua está incluida exactamente una hebra de ADN y exactamente una partícula en cada caso. A la superficie de la partícula está unido covalentemente un cebador, un par de cebadores (directo e inverso). Si solo está unido un cebador (directo o inverso), el otro cebador se pone a disposición disuelto en fase acuosa. Si está presente un par de cebadores, la amplificación transcurre correspondientemente a la amplificación puente descrita anteriormente. En el caso de amplificación puente en la perla, si se desea, también tras la reacción se pueden desprender de nuevo uno de los cebadores y hebras unidas covalentemente por medio del cebador (oligonucleótidos, contrahebras). En consecuencia, en todos los casos se puede cubrir la partícula total con copias de oligonucleótido original mediante la amplificación. Tras la amplificación, los oligonucleótidos, las contrahebras, o ambos, pueden estar unidos a la superficie mediante enlace covalente. Los oligonucleótidos unidos mediante enlace no covalente o las contrahebras unidas mediante enlace no covalente se pueden transformar en fase líquida mediante condiciones ambientales apropiadas (contenido en sales, temperatura, etc.), permaneciendo en este caso como hebras simples sobre la partícula los oligonucleótidos unidos mediante enlace covalente o las contrahebras unidas mediante enlace covalente. En una forma de realización preferente, tras una amplificación y una eliminación de las contrahebras, una pluralidad de oligonucleótidos están unidos a la partícula mediante enlace covalente. En esta PCR especial es posible amplificar exactamente un oligonucleótido en cada caso, de modo que se "copia" millones de veces en una bola polimérica (perla). Por lo tanto, al final de la PCR en emulsión se presentan millones de perlas, portando cualquiera de ellas millones de copias idénticas de otro oligonucleótido en cada caso. Se describen polimerizaciones y amplificaciones en emulsión, incluyendo partículas de fase sólida (perlas), en L. Metzker et al., *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 11, 2010, 31-46, y la literatura citada en la misma, como por ejemplo D. Dressman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003) 100, 8817-8822, así como en F. Diehl et al., *Nature Methods* (2006), Vol.3 N° 7, 551-559.

Si para la amplificación en emulsión se emplean sistemas con partículas disponibles comercialmente, a los que están unidas determinadas secuencias de cebador, en el procedimiento según la invención se emplean preferentemente oligonucleótidos que son compatibles con estas secuencias de cebador, o bien presentan puntos de enlace compatibles con estos cebadores. Si éste no es el caso, se efectúa un paso de ligazón con los denominados adaptadores, que son compatibles con los cebadores del sistema disponible comercialmente. O bien los oligonucleótidos se pueden hacer compatibles directamente mediante la selección apropiada de cebadores

durante una PCR. En este caso, estos cebadores contienen secuencias complementarias o idénticas, tanto para el sistema comercial como también para la biblioteca de oligonucleótidos.

En una PCR digital (dPCR) se distribuyen oligonucleótidos en un gran número de zonas de amplificación separadas espacialmente, y la PCR se lleva a cabo por separado en cada zona. En el caso ideal, una zona contiene aún un oligonucleótido aislado (correspondientemente a un 1) o no contiene oligonucleótido (correspondientemente a un 0). Una vez puesta en práctica la PCR, las zonas contienen correspondientemente un amplificado de un determinado oligonucleótido o no contienen amplificado. Para el aislamiento de oligonucleótidos individuales en zonas separadas se pueden emplear, a modo de ejemplo, placas con picopocillos, placas con micropocillos, capilares o conjuntos de cavidades miniaturizadas o superficies unidas a ácido nucleico. También la PCR en una emulsión, como se describe anteriormente, se calcula ocasionalmente para la PCR digital. La puesta en práctica de una PCR digital se describe, a modo de ejemplo, en el documento US 6,143,496, H. Nagai et al., Anal. Chem. 73, 2001; pp. 1043-1047; F. Shen et al., Lab Chip, 2010, vol. 10 (20), pp.2666-2672; B. G. Zimmermann et al., Prenat. Diagn., 2008, vol. 28 (12), pp. 1087-1093; Y. Gong et al., Lab Chip, 2010, vol. 10 (18), pp. 2334-2337; S. Lindstrom et al., Lab Chip, 2009, vol. 9 (24), pp. 3465-3471; J. S. Marcus et al., Anal. Chem., 2006, vol. 78 (3), páginas 956-958. Los procedimientos y medios para la puesta en práctica de PCR digital se encuentran disponibles comercialmente, a modo de ejemplo de la firma Fluidigm.

Asignación de una identificación específica

A cada amplificado separado espacialmente se asigna una identificación de emplazamiento específica por medio de la que éste es identificable claramente. La identificación se puede efectuar en principio de cualquier modo concebible, y es especialmente una identificación detectable por vía óptica, espectroscópica, radioactiva, electrónica (por ejemplo por medio de un código de barras o un chip RFID), por medio de la posición espacial o del orden de amplificados. En una variante, los amplificados se pueden dotar de una caracterización específica, a modo de ejemplo una secuencia de ADN adicional, una etiqueta de espectrómetro de masas o un marcaje isotópico. Si los amplificados están unidos al soporte, a modo de ejemplo una partícula de fase sólida como se describe anteriormente, de modo preferente está presente una identificación o un marcaje en el soporte o su posición. Al estar caracterizado, o bien marcado el soporte que porta el amplificado, también está caracterizado el amplificado enlazado. Identificaciones posibles pero no concluyentes son códigos de barras, códigos de colores, tamaño, forma, posición o disposición espacial, etiquetas de espectrómetro de masas, marcaje isotópico, marcaje de ADN.

En los procedimientos de la invención, los amplificados se disponen en diferentes lugares, y el lugar adopta una identificación clara, a modo de ejemplo una numeración de las coordenadas de emplazamiento. En una forma de realización, el procedimiento comprende la disposición de amplificados en zonas separadas espacialmente con, sobre o en uno o varios soporte(s) primeros, obteniéndose un conjunto de amplificados en el que se asigna una identificación de emplazamiento específica a cada amplificado como identificación específica. En esta forma de realización, la secuenciación de oligonucleótidos se efectúa en varios amplificados del conjunto. La secuencia de la clase de oligonucleótidos contenida en un amplificado se asigna a la identificación de emplazamiento específica del amplificado en el conjunto. En el análisis de propiedades de enlace de la estructura objetivo de aptámero se asignan la secuencia de la clase de oligonucleótidos contenida en un amplificado y la identificación de emplazamiento específica del amplificado a un resultado de enlace positivo o negativo. Son soportes ejemplares, sin limitación a los mismos, placas, chips, placas con picopocillos, geles, microconjuntos, los denominados soportes de polonio (literatura:<http://en.wikipedia.org/wiki/Polony>), amplificación puente, disposición espacial de gotas de agua en un aceite, por ejemplo un manguito (como una serie de perlas ubica gotas tras gotas en el mismo), o una placa con picopocillos, en una colección de micro/picocavidades de un chip microfluído o una superficie (con y sin estructura).

La disposición de los amplificados en diferentes lugares con, sobre o en un soporte puede estar combinada ya con el método de amplificación. En el caso de una amplificación a una fase sólida, ya la fase sólida puede ser el soporte, y los amplificados están dispuestos en un patrón regular o irregular en diferentes lugares sobre el soporte. En el caso de una PCR digital, los amplificados pueden estar unidos, a modo de ejemplo, a las paredes internas ya en las respectivas cavidades, o en superficies enlazantes de ácidos nucleicos contenidas en las cavidades, de modo que la disposición de las cavidades permite una asignación de la secuencia como marcaje espacial.

En el caso de una PCR en emulsión, los amplificados pueden estar presentes, por ejemplo, en forma disuelta en gotitas de fase acuosa, o unidos a partículas de fase sólida, que se encuentran en gotas acuosas, como se describió anteriormente. Las gotitas con amplificado disuelto se pueden distribuir e inmovilizar sobre un soporte plano. Las gotitas pueden estar fijadas en las respectivas posiciones en la superficie del soporte, a modo de ejemplo, mediante un revestimiento hidrófilo, de modo que las mismas están dispuestas sobre el soporte en una disposición espacial dada. A modo de ejemplo, el soporte puede presentar un patrón regular de puntos hidrófilos. Las gotitas pueden estar separadas entre sí en el soporte mediante una fase oleaginoso.

También se pueden introducir gotitas en cavidades de un soporte, en especial una placa con micro-, nano- o picopocillos, o de un chip secuenciador. Se describe un sistema de emulsión con enlace del ADN amplificado a un chip en Q. Ge et al., *Molecules* 2008, 13, 3057-3068.

5 En una forma de realización especialmente venajosa, los amplificados se presentan en la superficie de partículas de fase sólida, a modo de ejemplo tras una PCR en emulsión descrita anteriormente, y las partículas de fase sólida (perlas) con los amplificados se disponen en zonas separadas espacialmente con, sobre o en una o varias placas sólidas, obteniéndose un conjunto de amplificados. Las perlas se pueden disponer, y preferentemente inmovilizar sobre/en un gel, sobre una placa u otro soporte plano, a modo de ejemplo mediante reticulación química sobre una superficie con grupos químicos funcionales. En una forma de realización especialmente preferente, las perlas se introducen en cavidades de una placa con micro- o picopocillos, o de un chip secuenciador, a modo de ejemplo mediante centrifugado. Las dimensiones de perlas y cavidades se ajustan preferentemente de modo que una perla encaje exactamente en una cavidad.

Secuenciación

15 Como se ha mencionado, cada amplificado contiene predominantemente o, según medios de amplificación y condiciones de amplificación, de manera predominante o casi exclusivamente una clase de oligonucleótidos con secuencia idéntica, que coincide con la secuencia del oligonucleótido individual empleado como molécula de partida (matriz). Para descifrar la secuencia de oligonucleótidos en los amplificados se emplean los denominados procedimientos de secuenciación. Por el estado de la técnica son conocidas máquinas de secuenciación que se pueden utilizar en una mayoría de pasos de reacción y técnica para capturar en primer lugar oligo- o polinucleótidos obtenidos, en especial ADN, copiar y seleccionar éstos a continuación componente por componente. Por medio de la química de reacción seleccionada del método de secuenciación es posible calcular la secuencia de ADN del oligonucleótido contenido en el mismo para cada cavidad individual.

25 En el procedimiento según la invención, los oligonucleótidos se secuencian en amplificados presentes por separado espacialmente y caracterizados específicamente. La secuencia de la clase de oligonucleótidos en un amplificado se asigna a la identificación de emplazamiento específica del amplificado.

Antes de la secuenciación se eliminan contrahebras complementarias al oligonucleótido, contenidas preferentemente en el amplificado. Se obtiene un producto de los que se han eliminado estas contrahebras, y que se denomina además amplificado con los fines de la presente invención.

30 La eliminación de contrahebras se puede efectuar por diversos procedimientos, que son conocidos en sí por el especialista. En el caso de una PCR en emulsión con perlas o una PCR en fase sólida, como se ha descrito anteriormente, las perlas, o bien las superficies, portan, a modo de ejemplo, solo un cebador, y el otro se añade en disolución. De este modo, la hebra de oligonucleótido, que se obtuvo previamente mediante un enlace positivo contra el objetivo de aptámero, o la contrahebra se puede anclar directamente a la superficie por medio de PCR. Otras posibilidades son posibles mediante sistemas de enlace, como por ejemplo perlas cargadas con estreptavidina y cebadores con biotina. Se pueden generar hebras simples lavándose bajo condiciones desnaturalizantes, de modo que la contrahebra no deseada se libere fácilmente. La hebra de oligonucleótido permanece unida a la perla o a la superficie mediante enlace covalente y no se puede perder. Son procedimientos apropiados el lavado con tampón altamente salino, tampón SSC, hidróxido sódico diluido y/o calentamiento.

40 En el procedimiento según la invención se emplean preferentemente técnicas de secuenciación en las que los amplificados están dispuestos en zonas separadas espacialmente con, sobre o en uno o varios soportes sólidos, también denominados "plantillas". A este respecto se remite a la anterior divulgación en este aspecto. Cada amplificado dispuesto sobre el soporte se secuencia por separado.

45 Tales técnicas de secuenciación se denominan también "técnicas de secuenciación de la siguiente generación", o NGS (Next Generation Sequencing) en este caso y en la literatura pertinente. Las técnicas de secuenciación NGS se pueden basar en diversas formas de placa, algunas de las cuales se encuentran disponibles comercialmente, a modo de ejemplo de las firmas Roche (Roche/454), e Illumina/Solexa, Solid e Ion Torrent. Aporta una sinopsis sobre técnicas NGS L. Metzker et al., *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 11, 2010, 31-46.

50 La tecnología NGS, como se aplica en el sistema GS FLX 454 de Roche, se basa, entre otras, en técnicas que se describen en Wheeler, D.A. et al, *Nature* 452 (2008) 872, Shendure J.; Ji H., *Nature Biotechnology* 26 (2008) 1135-1145, en los documentos US 7,244,559, US 7,323,305, US 7,335,762, US 7,638,276. La tecnología Ion Torrent se basa en el mismo sistema de amplificación y posicionado de los amplificados, pero utiliza un transistor de efecto de campo para seleccionar las reacciones bioquímicas (J. M. Rothberg, *Methods and apparatus for measuring analytes using large scale fet arrays*, Pub.-Date: 21.Mai. 2009; Pub.-No.: US 2009/0127589 A1). No obstante, la geometría de la disposición de amplificados de ambas tecnologías se basa en un principio idéntico, y permite de este modo una

secuenciación altamente paralela de hasta 10^6 secuencias de ADN con aproximadamente 500 pares de bases de longitud en cada caso, siendo también posibles longitudes de secuencia más cortas. En esta técnica se introducen perlas, a cuya superficie está unido respectivamente un amplificado de un determinado oligonucleótido, en un chip de secuenciación. El chip contiene millones de pequeñas cavidades, que presentan en cada caso una dimensiones
 5 tales que en cada cavidad se ajusta exactamente una perla. Después se puede cargar el chip con perlas menores, que contienen todas las enzimas para la reacción de secuenciación. No obstante, esto no es imprescindible, sino una forma de realización preferente de la propia técnica de secuenciación. En la secuenciación que sigue ahora se genera una señal lumínica en el sistema 454 FLX, una carga eléctrica por medio de iones H^+ en el caso de Ion
 10 Torrent, si se incorpora una base de ADN. La señal se registra paralelamente para cada cavidad y, de este modo, para cada perla, y se puede convertir entonces en una secuencia de ADN. Por consiguiente, un único chip NGS permite el registro de hasta mil millones de pares de bases y más. El principio de secuenciación y los procesos que se desarrollan en la secuenciación se explican, entre otros, en M. Ronaghi, *Genome Res.* (2001) 11, 3-11yM. Margulies et al., *Nature* (2005) vol. 437, 376-380.

Alternativamente a los sistemas NGS basados en perlas, también existen aquellos que emplean una amplificación puente (por ejemplo Solexa). En este caso, los oligonucleótidos se unen en distribución estadística sobre una superficie, y se amplifican de modo que se producen 10^5 copias del oligonucleótido original por cada punto de enlace. Estas zonas de amplificación individuales son casi siempre circulares para disponer el oligonucleótido original. En la forma de realización de secuenciación de la firma Illumina, esta disposición espacial se analiza por medio de la incorporación de diferentes nucleótidos fluorescentes (US Pat. App 12878687, NUCLEIC ACID
 15 SEQUENCING SYSTEM AND METHOD). Sin embargo, un análisis de esta disposición espacial es igualmente posible por medio de los principios de detección de 454 FLX o Ion Torrent, para deducir la secuencia de la misma. Se remite a las explicaciones en el documento US 6,300,070, así como L Metzker et al., *Nature Reviews, Genetics*, Vol. 11, 2010, 31-46yAbrams et al., *Diagnostic and Gene Detection Ch.* (1997) 171-189. Adicionalmente, en este diseño de secuenciación, la secuencia de ADN se determina frecuentemente por medio de una ligazón de diferentes
 20 oligonucleótidos con etiqueta fluorescente. También en este caso, la secuencia de oligonucleótidos se puede seleccionar de modo que ésta sea accesible a esta secuenciación y se encuentre disponible para una medida de enlace posterior de los oligonucleótidos/aptómeros.

Análisis de las propiedades de enlace

Finalmente, el análisis de las propiedades de enlace de todas las clases de oligonucleótidos dispuestos en el conjunto de amplificados tiene lugar en la estructura objetivo de aptámero. A tal efecto se ponen en contacto oligonucleótidos, que presentan la secuencia de la clase de oligonucleótidos que está contenida en los amplificados, con la estructura objetivo de aptámero. En una variante de procedimiento, los aptámeros separados espacialmente se pueden poner en contacto con la estructura objetivo de aptámero. Ésta no es necesariamente el propio
 30 amplificado y oligonucleótidos contenidos en el mismo, que se ponen en contacto con la estructura objetivo de aptámero. El concepto "análisis de las propiedades de enlace de todas las clases de oligonucleótidos" comprende también la investigación de oligonucleótidos que presentan la misma secuencia que los oligonucleótidos de una clase determinada y, por consiguiente, se pueden asignar a la clase, pero que ya no están contenidos en los amplificados caracterizados. A modo de ejemplo, se pueden generar y analizar copias de oligonucleótidos como se indica a continuación en formas de realización especiales. El concepto "análisis de las propiedades de enlace de
 35 todas las clases de oligonucleótidos" comprende también, en especial, que los oligonucleótidos se pongan en contacto con la estructura objetivo de aptámero en los amplificados y/o que las copias de oligonucleótidos se pongan en contacto con la estructura objetivo de aptámero.

El concepto "asignación de las propiedades de enlace analizadas a las identificaciones específicas de los amplificados" significa la creación de una relación de una clase de oligonucleótidos analizada respecto al amplificado
 40 en el que se puede encontrar la clase, con ayuda de su caracterización. A partir de la secuenciación es conocida la secuencia de la clase de oligonucleótidos, su secuencia y la identificación del correspondiente amplificado.

Las propiedades de enlace se pueden clasificar por medio de una escala de valores seleccionada determinada. Se puede efectuar una clasificación de manera cualitativa y/o cuantitativa. A modo de ejemplo, se puede efectuar una serie de oligonucleótidos analizados, de la señal más alta a la más baja. A modo de ejemplo, una asignación
 45 cualitativa puede llegar de ninguna afinidad a una afinidad muy elevada. Además, en base a uno o varios valores límite determinados se puede diferenciar en niveles de calidad. Entre otras, en el caso de una medición de fluorescencia y RfFS, como se describe a continuación, las propiedades de enlace se pueden representar como intensidades con unidad relativa.

El procedimiento se puede denominar también procedimiento para la investigación de oligonucleótidos con el fin de
 50 caracterización, identificación, obtención y/o selección de aptámeros o aptámeros potenciales.

5 Durante o tras el análisis de las propiedades de enlace, los oligonucleótidos se identifican como aptámeros. La identificación se puede efectuar por medio de una clasificación, como se describe a modo de ejemplo. Los oligonucleótidos identificados son preferentemente aquellos que presentan una propiedad de enlace para la estructura objetivo, o aquellos en los que es determinable un resultado de enlace. El procedimiento puede comprender un paso de selección, seleccionándose oligonucleótidos identificados como aptámeros a partir de todos los oligonucleótidos analizados.

Los oligonucleótidos identificados como aptámeros se pueden aislar opcionalmente o sintetizar de manera reciente.

En una variante, el análisis de las propiedades de enlace puede comprender en especial:

- 10
- i) La asignación de un resultado de enlace positivo o negativo para la identificación específica del amplificado y de la secuencia de la clase de oligonucleótidos contenida en el amplificado, y
 - ii) La identificación de oligonucleótidos, en los cuales se determina un resultado de enlace positivo, como aptámeros para la estructura objetivo.

15 Se puede definir un resultado de enlace positivo, a modo de ejemplo, como una determinada diferencia de señal detectable respecto a la señal básica, o bien un control negativo, en el que no se efectúa un enlace. Además son posibles diferenciaciones a través de la altura de señal.

Antes del análisis de las propiedades de enlace se eliminan preferentemente contrahebras contenidas en el amplificado, complementarias al oligonucleótido. Esto se puede efectuar como se describe anteriormente bajo el punto "secuenciación". Si las contrahebras se eliminaron ya antes de la secuenciación, como se describe anteriormente, este paso está de más.

20 El análisis de las propiedades de enlace se puede efectuar con todos los métodos que son ya conocidos por el estado de la técnica para aptámeros, en especial con métodos de determinación de afinidad de aptámero con el objetivo.

25 Un resultado de enlace de aptámero con el objetivo se puede detectar con diversos métodos comunes que son ya conocidos por el estado de la técnica, en especial mediciones de afinidad. Si el aptámero se pone en contacto con el objetivo, se forma un complejo aptámero-objetivo mediante unión del aptámero al objetivo. El enlace, o bien el resultado de enlace, se puede identificar, a modo de ejemplo, por vía visual, óptica, fotónica, electrónica, acústica, opto-acústica, según masa, por vía electroquímica, electroóptica, espectrométrica, enzimática o química de otro tipo, bioquímica o física.

30 El complejo se puede hacer visible mediante un marcaje, a modo de ejemplo en una reacción de indicador tras un acoplamiento directo o indirecto de un reactivo complejo con una sustancia de marcaje. El aptámero empleado o el objetivo pueden estar provistos de un marcaje (etiqueta). Marcajes (etiquetas) preferentes son detectables por vía visual, óptica, fotónica, electrónica, acústica, opto-acústica, según masa, por vía electroquímica, electroóptica, espectrométrica, enzimática o física, química o bioquímica de otro tipo. En una forma de realización del procedimiento, el marcaje se identifica mediante luminiscencia, espectroscopía UV/VIS, por vía enzimática, electroquímica o radioactiva.

35

Luminiscencia se refiere a la emisión de luz. En el procedimiento según la invención se aplican, a modo de ejemplo, la fotoluminiscencia, la quimioluminiscencia y la bioluminiscencia para la identificación del marcaje. En el caso de fotoluminiscencia o fluorescencia, la activación se efectúa mediante absorción de fotones. Fluoróforos ejemplares son, sin limitación, bisbenzimidazol, fluoresceína, naranja de acridina, Cy5, Cy3 o yoduro de propidio, que se pueden acoplar a aptámeros mediante enlace covalente, tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), Texas Red (TR), rodamina, colorantes de Alexa Fluor (entre otras colorantes fluorescentes de diferentes longitudes de onda de diversas firmas). La valoración se efectúa visualmente o con correspondientes aparatos de medición, por ejemplo en contador multietiqueta, en microscopio de fluorescencia, o mediante citometría de flujo, por ejemplo en el citofluorímetro. La quimioluminiscencia describe la emisión de luz visible como consecuencia de una reacción química.

40

45 Bioluminiscencia designa la emisión de luz visible como consecuencia de una reacción enzimática, a modo de ejemplo de una reacción redox catalizada a través de la enzima luciferasa.

Otras sustancias de marcaje son catalizadores, partículas metálicas coloidales, por ejemplo nanopartículas de oro, partículas coloidales no metálicas, puntos cuánticos, polímeros orgánicos, partículas de látex o liposomas con sustancias generadoras de señal. Las partículas coloidales se pueden identificar por colorimetría.

50 Como marcadores son también empleables enzimas, cuya reacción enzimática está caracterizada por el consumo o la producción de sustratos o productos detectables, pudiéndose aplicar una detección óptica o electroquímica sin

limitación. Una identificación se puede llevar a cabo, por ejemplo, con enzimas como sustancias de marcaje para transformar los sustratos en productos incoloros, preferentemente peroxidasa, proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa, [beta]-galactosidasa o fosfatasa alcalina. A modo de ejemplo, el sustrato incoloro X-Gal se puede transformar en un producto azul, cuya coloración se registra visualmente, mediante la actividad de [beta]-galactosidasa.

La identificación se puede efectuar también por medio de isótopos radioactivos, con los que está marcado el aptámero, preferentemente 3H, 14C, 32P, 33P, 35S o 125I, de modo especialmente preferente 32P, 33P o 125I. En el recuento de escintilación se mide indirectamente la radiación radioactiva emitida por el complejo aptámero-objetivo con marcaje radioactivo. Una sustancia de escintilación se activa mediante la radiación radioactiva. En el caso de paso al estado básico, la energía de excitación se libera de nuevo como destellos de luz, que se intensifican por medio de un multiplicador de fotoelectrones (fotomultiplicador) y se recuentan.

Los aptámeros pueden también estar marcados con digoxigenina o biotina, que se unen, a modo de ejemplo, a través de anticuerpos o estreptavidina, que pueden portar a su vez un marcaje, como por ejemplo un conjugado enzimático. El enlace covalente previo (conjugación) de un anticuerpo con una enzima se puede efectuar de diversas maneras conocidas. La identificación del enlace con anticuerpo se puede efectuar también por vía radioactiva en un RIA (inmunoensayo radioactivo) con isótopos radioactivos, preferentemente con 125I, o mediante fluorescencia en un FIA (inmuno ensayo de flúor) con fluoróforos, preferentemente con fluoresceína o FITC.

En una forma de realización especialmente ventajosa, para la detección de un resultado de ensayo se emplea un método de detección exento de etiqueta, que se basa en la denominada espectroscopía de interferencia reflectométrica basada en imagen (a continuación iRIfS). El método se basa en que, debido a la interferencia en capas delgadas, la adición de moléculas a una superficie se puede registrar mediante un desplazamiento del patrón de interferencia. El procedimiento se puede emplear también para la medición de una cinética de enlace. Las bases del procedimiento se describen en C. Hanel et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (2002) 91-100, J. Piehler et al. *Analytical Biochemistry*, 249 (1997) 94-102y en el documentoUS2010297671. Con el método iRIfS se puede llevar a cabo una selección de reacciones de enlace en microconjuntos en tiempo real y sin etiqueta. En la presente invención se puede efectuar un análisis altamente paralelo de resultados de enlace y la determinación de constantes de enlace. Con iRIfS se puede determinar en tiempo real si tiene lugar, y en qué medida y con qué parámetros cinéticos, una interacción entre las moléculas objetivo y cada amplificado aislado. La cinética de enlace y las constantes de afinidad de todos los aptámeros en el ensayo se pueden determinar paralelamente. Además, simultáneamente se pueden efectuar investigaciones paralelas respecto a la afinidad con el objetivo bajo condiciones diferentes (temperatura, pH, contenido en sales, etc.) y respecto a la especificidad, pudiéndose analizar hasta 10⁶amplificados en un conjunto.

A continuación se indican otras formas de realización y variantes especiales, así como complementos del procedimiento descrito anteriormente: la puesta en contacto de oligonucleótidos, que presentan la secuencia de la clase de oligonucleótidos que está contenido en los amplificados, con la estructura objetivo de aptámero, se puede efectuar de diferentes maneras, como se describe a continuación.

En una forma de realización del procedimiento se pone en contacto un conjunto de amplificados, como se describe anteriormente, con la estructura objetivo de aptámero. A modo de ejemplo, los amplificados, que están dispuestos en cavidades separadas de un chip de ADN, una placa de microtitración o una placa con micropocillos, se pueden incubar con un líquido que contiene la estructura objetivo de aptámero.

Generación de copias y derivados del conjunto

En otra forma de realización, el procedimiento comprende:

- La generación de una copia o de un derivado del conjunto de amplificados con, sobre o en un segundo soporte, asignándose a cada amplificado de la copia o del derivado una identificación de emplazamiento específica como identificación específica,
- La puesta en contacto de la copia o del derivado del conjunto con la estructura objetivo del aptámero.

En esta forma de realización, directamente a partir de un conjunto de amplificados (también "conjunto" a continuación) sobre, con o en un primer soporte, a modo de ejemplo un chip de secuenciación, se copian oligonucleótidos o amplificados o derivados de oligonucleótidos o de amplificados sobre un segundo soporte, conservándose la estructura del conjunto y, de este modo, la identificación de emplazamiento específica de los amplificados del conjunto. Por consiguiente, la identificación de emplazamiento específica que se asigna a los amplificados en la copia o el derivado se basa en la identificación de emplazamiento específica de los amplificados en el conjunto, que sirve como alimentación. Cualquier posición espacial del original se puede asignar claramente a una información de emplazamiento en la copia, y viceversa.

La forma de realización posibilita en especial la producción de una copia de un microconjunto a partir de una asignación de secuencias de oligonucleótidos a partir de una secuenciación (por ejemplo conjunto de partículas en un secuenciador de ABI o Roche 454, o una superficie plana, como de una Solexa de Illumina).

5 Según la invención, por una copia se puede entender una copia 1 : 1 de los oligonucleótidos originales, mientras que por un derivado se puede entender una modificación de los oligonucleótidos originales, a modo de ejemplo derivados o subconjuntos de oligonucleótidos originales.

10 En principio, el proceso de copia se puede repetir varias veces, de modo que se puede producir una pluralidad de copias idénticas de microconjunto de oligonucleótidos, por ejemplo a partir de un chip secuenciador. En este caso se conserva la alimentación. Mediante esta forma de realización se facilita de nuevo la identificación de aptámero y la investigación en muchas muestras paralelas, ya que se pueden llevar a cabo las más diversas investigaciones en diferentes copias y se pueden generar nuevas copias en caso necesario. A modo de ejemplo, se pueden determinar paralelamente cinéticas de enlace y las constantes de afinidad de todos los aptámeros en copias del conjunto. Además, se pueden efectuar investigaciones paralelas respecto a la afinidad con el objetivo bajo diversas condiciones (temperatura, pH, contenido en sales, etc.) y respecto a la especificidad.

15 Una copia se analiza en especial con la técnica iRlfS exenta de etiqueta, que se explicó anteriormente, lo que posibilita, entre otras cosas, un análisis de afinidad de todos los oligonucleótidos en la copia de conjunto generada.

20 Antes de la puesta en contacto de la copia o del derivado del conjunto con la estructura objetivo de aptámero se eliminan preferentemente contrahebras complementarias a los oligonucleótidos, que pueden estar presentes en los amplificados de la copia o del derivado. Esto se puede efectuar con métodos conocidos, de los que se enumeran algunos en el punto "secuenciación".

25 En esta forma de realización, el segundo soporte presenta en especial un adaptador de enlace para oligonucleótidos o propiedades de enlace para oligonucleótidos, y la copia o el derivado se generan uniéndose oligonucleótidos de los amplificados al soporte por medio del adaptador de enlace o de las propiedades de enlace. Los adaptadores de enlace son preferentemente oligonucleótidos, en la mayor parte de los casos preferentemente con la longitud y función de un cebador para una PCR. Los adaptadores de enlace presentan preferentemente secuencias que son complementarias a una parte de la secuencia de la contrahebra de oligonucleótidos, o bien contienen secuencias que son idénticas al oligonucleótido. En el caso de una amplificación que se lleva a cabo en el segundo soporte, el adaptador de enlace se puede prolongar en una hebra de oligonucleótido, que está unida a la superficie del segundo soporte mediante enlace covalente. En este caso, el oligonucleótido generado puede ser idéntico o complementario al oligonucleótido original. Los adaptadores de enlace pueden presentar también secuencias que son complementarias a una parte de la secuencia de la hebra de oligonucleótido. En el caso de una amplificación, que se lleva a cabo en el segundo soporte, el adaptador de enlace se puede prolongar para dar una contrahebra de oligonucleótido, que está unida a la superficie del segundo soporte mediante enlace covalente.

35 Esta forma de realización posibilita además copiar conjuntos de amplificado, también sin tener conocimiento de la información bioquímica o de la secuencia. Esto posibilita duplicar una copia de la disposición de oligonucleótidos de la misma ya antes de, tras o durante un proceso de secuenciación, y crear de este modo una copia de conjunto sin poseer un conocimiento de las secuencias. Únicamente la asignación de la información de emplazamiento en la copia debe permitir una asignación a las informaciones de secuencia del sistema secuenciador.

40 Por consiguiente, la forma de realización posibilita la producción de una copia de conjunto directamente antes de, tras o durante la secuenciación descrita anteriormente, también sin conocimiento de las secuencias de oligonucleótidos individuales. Es posible secuenciar la copia producida en esta forma de realización para verificar la identidad de los aptámeros en los amplificados copiados. Por consiguiente, en la copia de conjunto se pueden efectuar en principio los mismos pasos que en la alimentación del conjunto. Por lo tanto, la secuenciación se puede llevar a cabo antes de, durante o tras la elaboración de la copia con el original o la copia.

45 Según esta forma de realización se puede producir una copia o un derivado antes de, durante o tras la secuenciación o la amplificación, o una de las copias puede servir a su vez como alimentación de una secuenciación. De modo preferente, la unión de las copias o derivados al segundo soporte se efectúa simultáneamente o tras la amplificación. Una producción de la copia o del derivado antes de la amplificación se puede efectuar, por ejemplo, bajo empleo del sistema Solexa. En este caso, antes de, durante, o tras la amplificación se generan ulteriormente amplificados del oligonucleótido original, y después se transfieren a un segundo soporte. Respecto al oligonucleótido original, se pueden transferir amplificados tanto complementarios como también idénticos. Este segundo soporte puede ser, a modo de ejemplo, un chip de secuenciación de un 454 de Roche. También es concebible hacer una copia con el sistema 454 der Roche antes de, durante o tras una secuenciación, y alimentar a un secuenciador SOLEXA y secuenciar de nuevo la misma.

55 Una variante especial de esta forma de realización comprende los siguientes pasos

- La puesta a disposición de al menos una zona de medio de amplificación limitada espacialmente para cada oligonucleótido, que está separado de las zonas de medio de amplificación de los demás oligonucleótidos, limitando una superficie del segundo soporte, provista del adaptador de enlace o de propiedades de enlace, con las zonas de medio de amplificación,
- 5 - La amplificación de oligonucleótidos a través de medios de amplificación en las zonas de medio de amplificación para la generación de amplificadas de los oligonucleótidos,
- La unión de hebras simples de amplificadas o derivados de amplificadas al segundo soporte por medio del adaptador de enlace o de las propiedades de enlace, de modo que una disposición espacial de las hebras simples en el segundo soporte corresponde a la disposición espacial de los amplificados en el conjunto del
- 10 que proceden las hebras simples; y
- La eliminación del segundo soporte con las hebras simples enlazadas del conjunto.

Las zonas de medio de amplificación limitadas espacialmente se pueden definir al menos parcialmente mediante micro- o nanoestructuras en el primer soporte que porta el conjunto, o en el segundo soporte que porta la copia o el derivado; la amplificación según la anterior forma de realización puede ser idéntica a la amplificación separada espacialmente, como se describe anteriormente por medio del procedimiento general. En este caso tiene lugar la amplificación separada espacialmente en las zonas de medio de amplificación.

La amplificación según la anterior forma de realización puede ser también otro (por ejemplo un segundo) paso de amplificación, que se lleva a cabo tras la amplificación separada espacialmente, que se describió previamente por medio del procedimiento general. Por ejemplo, es posible que las perlas, que portan una mayoría de oligonucleótidos unidos mediante enlace covalente tras una primera amplificación, separada espacialmente, y una eliminación de hebras simples de oligonucleótido, se pongan en contacto en las zonas de medio de amplificación con un medio de amplificación, que conduce a la síntesis de una contrahebra de oligonucleótido en la amplificación. Por lo tanto, la amplificación según la anterior forma de realización puede significar la síntesis de contrahebras. El concepto "amplificado de oligonucleótidos" comprende las contrahebras en este caso. Mediante una selección modificada del cebador también es posible generar oligonucleótidos idénticos al oligonucleótido original como amplificado.

En el caso de las hebras simples de amplificadas, que se unen al segundo soporte, se puede tratar de hebras simples de oligonucleótido y/o de sus contrahebras complementarias, preferentemente de las contrahebras. La unión se efectúa preferentemente mediante hibridación de hebras simples de oligonucleótido y/o sus contrahebras complementarias en el adaptador de enlace con una secuencia.

Un adaptador de enlace en la superficie del segundo soporte presenta preferentemente una secuencia que es complementaria a una parte de la secuencia de la contrahebra de oligonucleótido. Las contrahebras se unen mediante hibridación al adaptador de enlace. A continuación se lleva a cabo preferentemente una amplificación ulterior en el segundo soporte, en el que el adaptador de enlace se alarga para dar una hebra de oligonucleótido. Como resultado se obtienen oligonucleótidos unidos a la superficie del segundo soporte mediante enlace covalente. Este paso de amplificación ulterior se puede efectuar antes o después de la eliminación del segundo soporte. Las contrahebras ya innecesarias se pueden eliminar, mencionándose ya procedimientos habituales (lavado con tampón, calentamiento).

En una variante, la generación de al menos una zona de medio de amplificación limitada espacialmente para cada oligonucleótido presenta una puesta a disposición de oligonucleótidos en cavidades separadas asignadas en cada caso en el primer soporte que porta el conjunto, una introducción del medio de amplificación en las cavidades, y un cierre de las cavidades mediante el segundo soporte. A modo de ejemplo, el segundo soporte puede ser un soporte plano, que se coloca sobre un primer soporte con cavidades, como una placa con micro- o picopocillos, encontrándose en las cavidades los oligonucleótidos a amplificar (por ejemplo en el caso de PCR digital, como se describe anteriormente). El segundo soporte cierra las cavidades, y se forman zonas de medio de amplificación concluidas. En las cavidades están presentes los medios de amplificación necesarios, y en la amplificación se forma preferentemente una copia de los amplificados en el segundo soporte de manera simultánea. El segundo soporte puede ser un soporte plano, y sobre el mismo se puede producir una copia en forma de un conjunto plano. Tal procedimiento se describe en el documento WO2010100265. En una variante del mismo están presentes perlas con un oligonucleótido unido a la superficie de una determinada secuencia en cavidades de un primer soporte, y el segundo soporte se coloca como soporte plano sobre el segundo soporte con cavidades. A continuación se lleva a cabo una amplificación, y simultáneamente se genera una copia sobre el segundo soporte. Se describe un ejemplo de realización en el documento WO2010100265, en relación con las Fig. 1a a Fig. 1d del mismo.

En otra variante, la generación de al menos una zona de medio de amplificación limitada especialmente presenta una puesta a disposición del segundo soporte con al menos una cavidad asignada a cada oligonucleótido, en la que está dispuesto el adaptador de enlace, una introducción del medio de amplificación en las cavidades y un cierre de las cavidades por medio del primer soporte, de modo que los oligonucleótidos están expuestos a la zona de medio de amplificación. Se describe un ejemplo de realización en el documento WO2010100265, en relación con las Fig. 4a-4c del mismo.

En otra variante de esta forma de realización, las zonas de medio de amplificación limitadas espacialmente están separadas por límites de fase entre dos líquidos, un líquido y un gas o un límite físico. También es concebible disponer gotas de emulsión sobre un primer soporte, conteniendo cada gotita un oligonucleótido de una determinada secuencia y medio de amplificación, como se describe anteriormente por medio de la PCR en emulsión. Las gotitas se pueden fijar a las respectivas posiciones en la superficie del primer soporte mediante un revestimiento hidrófilo, de modo que éstas están colocadas en una disposición espacial dada en el soporte. A modo de ejemplo, el soporte puede presentar un patrón regular de puntos hidrófilos. El segundo soporte se imprime, de modo que entra en contacto con las gotitas con la superficie, que presenta preferentemente un adaptador de enlace. En el caso de una amplificación en las gotitas se produce simultáneamente una copia en el segundo soporte. Se describe un ejemplo de realización en el documento WO2010100265, en relación con las Fig. 5a a Fig. 5d del mismo.

Durante diversos pasos de copia se pueden producir modificaciones en forma química del conjunto, que contiene, a modo de ejemplo, determinados marcadores o secuencias, de modo comparable a una copia de color, en la que se copia solo la proporción de amarillo.

Se explican otros aspectos de esta forma de realización en el documento WO002010100265.

Pasos de procedimiento adicionales con una copia de conjunto, recuperación y selección

En un complemento de la anterior forma de realización, el procedimiento comprende la recuperación de una o varias clases de oligonucleótidos a partir de una copia mediante eliminación de los oligonucleótidos del primer, del segundo soporte, o de una copia de estos soportes. Copias ulteriores de copias del soporte, que se obtuvieron a partir de un conjunto con/sobre/en un primer soporte, o copias de la copia en el segundo soporte, siendo empleables los procedimientos de copia ya abordados. No obstante, una forma de realización preferente prevé el empleo de segundos soportes, en especial de copias de ADN de una secuenciación. En esta forma de realización, los oligonucleótidos o sus amplificadas están inmovilizados, de modo que se pueden liberar mediante disolución local. En el caso de un conjunto de ADN copiado en un segundo soporte bajo empleo de fotoreticulantes, esto se puede aplicar de modo que los oligonucleótidos están enlazados, pero se pueden desprender mediante irradiación de un láser de onda corta. Tras el análisis de enlace, a modo de ejemplo por medio de iRIfS, se puede desprender y eluir selectivamente un aptámero mediante irradiación de láser. El eluato se encuentra disponible directamente para otros pasos, como una PCR. Por consiguiente, el aptámero se puede amplificar directamente, y no se debe sintetizar reiteradamente de nuevo. En tanto esté previsto una agrupación de epítomos, como se describe a continuación, los aptámeros recuperados se pueden someter a ensayo como aptámeros secundarios, y de este modo se pueden identificar inmediatamente sus componentes de enlace para una estructura tipo sandwich. Si se liberan simultáneamente otros aptámeros en cada caso, esta reserva de aptámeros permite además la aplicación de otro paso de selección (enlace de la reserva de aptámeros con el objetivo, eliminación de no enlazantes, elución de enlazantes del objetivo), en especial en combinación con una mutación de la reserva. No obstante, en este caso se puede alimentar selectivamente cualquier secuencia a la reserva, o ésta puede contener la misma. Por consiguiente, existe una influencia sensiblemente mayor que en el procedimiento SELEX previo sobre la reserva de aptámeros para el siguiente paso de selección.

En otro complemento de la forma de realización previa, el procedimiento comprende la producción de otros oligonucleótidos mediante amplificación de oligonucleótidos de la copia, que están unidos sobre el segundo soporte. Los conjuntos copiados portan todos los aptámeros en la superficie. Debido al proceso de producción de la copia, ahora es posible llevar a cabo una PCR sobre la superficie del conjunto, y obtener de este modo de nuevo una reserva de aptámero para una ronda siguiente, y mutar la misma del mismo modo a continuación. Mediante selección de cebadores apropiados para PCR es posible obtener además subreservas de oligonucleótidos.

En otro complemento de la forma de realización previa, es posible recuperar y amplificar ADN complementario soluble en relación con los aptámeros, que se produce durante el proceso de copia. De este modo se genera de nuevo una reserva de todos los aptámeros que se introdujeron en la secuenciación. Mediante selección apropiada del cebador es posible obtener nuevamente los aptámeros como ssADN de manera selectiva. Esta reserva se encuentra entonces disponible para una ronda de SELEX adicional, y también se puede mutar para generar de nuevo una nueva biblioteca.

En otro complemento de la forma de realización previa, se obtienen subreservas de aptámeros a partir de la copia o el exceso del proceso de copia. Ya que, debido a la secuenciación, las secuencias son conocidas, es posible amplificar selectivamente motivos de secuencia individuales por medio de cebadores apropiados. Esto es posible tanto a partir del exceso del proceso de copia como también a partir del conjunto de ADN generado. Por consiguiente, se pueden generar subreservas individuales de la reserva de aptámeros secuenciada originalmente.

Paso de selección adicional

En otra forma de realización del procedimiento, los amplificados están unidos a partículas de fase sólida, y el

procedimiento comprende además los siguientes pasos:

- La puesta en contacto de partículas de fase sólida a las que está unido respectivamente un amplificado con una clase de oligonucleótidos, con estructura objetivo de aptámero,
- La determinación de un resultado de enlace positivo o negativo de la estructura objetivo de aptámero en oligonucleótidos del amplificado, que está unido a una partícula de fase sólida,
- La selección de partículas de fase sólida en las que es verificable un resultado de enlace positivo.

Las partículas de fase sólida seleccionadas, en las que es verificable un resultado de enlace positivo, se pueden disponer en zonas separadas espacialmente, con, sobre o en uno o varios soportes sólidos, obteniéndose un conjunto de amplificados. En este caso, el concepto "selección" significa en especial la separación de partículas de fase sólida en las que es verificable un resultado de enlace positivo de otras partículas de fase sólida.

No obstante, las partículas de fase sólida pueden estar dispuestas también con, sobre o en un soporte sólido y formar un conjunto antes de la puesta en práctica de los anteriores pasos de procedimiento. En especial, el concepto "selección" significa entonces que otros pasos de procedimiento, como la secuenciación descrita a continuación, se llevan a cabo con partículas de fase sólida en las que es verificable un resultado de enlace positivo.

Como se ha descrito anteriormente por medio del procedimiento fundamental, se pone en contacto una mezcla de oligonucleótidos con una estructura objetivo de aptámero, y al menos una parte de los oligonucleótidos se unen a la estructura objetivo. A continuación, los oligonucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero se separan de la estructura objetivo de aptámero y de oligonucleótidos no unidos a la estructura objetivo de aptámero. En este caso se trata de una selección análoga a un proceso SELEX, estando preferentemente inmovilizado el objetivo y presentándose los oligonucleótidos en disolución. Debido a esta selección, se puede partir de que el ADN de cada una de las partículas de fase sólida (perlas) a las que están unidos los amplificados generados de oligonucleótidos seleccionados, presenta una afinidad con el objetivo. No obstante, si los oligonucleótidos se sometieron a ensayo contra el objetivo inmovilizado en la selección análoga a SELEX en disolución, la unión de los aptámeros puede haber modificado la afinidad. Para verificar esto, el paso de selección ulterior contenido en esta forma de realización (también denominado "selección de prueba") es ventajoso, ya que las perlas se incuban con el objetivo, se seleccionan aquellas perlas en las que es verificable un resultado de enlace positivo, y en procedimientos ulteriores para la secuenciación y pasos subsiguientes se consideran solo las perlas que se unen contra el objetivo también en este paso de selección ulterior.

Con esta forma de realización se mejora la calidad de los enlazantes y se eliminan de nuevo los no enlazantes. Con este paso opcional se puede seleccionar de nuevo y, de este modo, mejorar en un sentido deseado, o bien optimizar la afinidad de los aptámeros ya seleccionados. Mediante la posible selección doble, en primer lugar aptámero libre contra objetivo enlazado, y a continuación aptámero enlazado contra objetivo libre, se puede obtener una tasa de acierto más elevada para aptámeros, que se unen a su objetivo tanto en forma inmovilizada como también en forma no enlazada en disolución. Además se garantiza mejor que el aptámero se una al objetivo, tanto presente en disolución como también inmovilizado.

Son concebibles diferentes formas de realización de la selección de la reserva, de las cuales se enumeran algunas en este caso:

- Por medio de un objetivo con etiqueta fluorescente se puede efectuar una estimación de afinidad a través de la fluorescencia de la perla. Esto se puede efectuar, a modo de ejemplo, con un aparato FACS (por ejemplo Fluorescence assisted cell sorting). Después se pueden clasificar las perlas en reservas con diferente fluorescencia, y a continuación se pueden secuenciar estas reservas por separado para obtener de este modo aptámeros de diferente calidad de enlace.
- En el caso de pequeñas perlas magnéticas en las que se inmoviliza el soporte se puede efectuar una unión de oligonucleótidos al objetivo. De este modo se puede efectuar una separación magnética. Solo perlas de amplificado que se unen al objetivo inmovilizado interaccionan con las perlas magnéticas y se separan a continuación. A través de una separación en diferentes intensidades de campo magnéticas se puede efectuar igualmente una formación de reserva en zonas de diferente afinidad.
- Además son concebibles cargas competitivas, en las que se emplean, a modo de ejemplo, un objetivo y una molécula similar, y a continuación se selecciona según afinidad común o diferente. Por ejemplo, si el objetivo presenta etiqueta fluorescente verde y la molécula similar presenta etiqueta fluorescente roja, se puede diferenciar en perlas que se unen solo al objetivo (verde), solo a la molécula similar (rojo), y que se unen a ambos (amarillo) y, de este modo, aptámeros.
- También es concebible una selección según cinética de activación o desactivación. A tal efecto, las perlas se incuban brevemente de modo correspondiente, y después se miden inmediatamente (cinética de activación rápida, decisiva para la elevada intensidad de fluorescencia), o se incuban durante un tiempo prolongado y en alta concentración, se lavan durante un tiempo muy prolongado y de manera intensiva, y después se miden (cinética de desactivación lenta, decisiva para la elevada intensidad de fluorescencia).

Identificación de pares de enlace de aptámero

El procedimiento según la invención se puede completar con otros pasos, que sirven para la identificación de pares de enlace de aptámero. De este modo, la invención se refiere también a un procedimiento para la identificación de pares de enlace de aptámero que se unen a diversos puntos de una estructura objetivo de aptámero, que comprende los pasos del procedimiento descrito anteriormente, y que comprende además:

- 5 a) La puesta en contacto del conjunto de amplificados o de la copia del conjunto de amplificados con la estructura objetivo de aptámero y unión de la estructura objetivo de aptámero a oligonucleótidos, que están contenidos en los amplificados del conjunto/de la copia del conjunto,
- 10 b) La puesta en contacto del conjunto contenido en a) o de la copia del conjunto con una mezcla de oligonucleótidos, y la unión de al menos una parte de oligonucleótidos a la estructura objetivo de aptámero, que ya está unida al conjunto,
- c) La elución de oligonucleótidos que no se han unido a la estructura objetivo de aptámero en b),
- d) La eliminación de oligonucleótidos unidos en b) de la estructura objetivo de aptámero,
- 15 e) La secuenciación de oligonucleótidos contenidos en d), y la producción o aislamiento de oligonucleótidos en forma pura según su clase,
- f) La puesta en contacto de un conjunto de amplificados o de la copia del conjunto de amplificados con la estructura objetivo de aptámero, y enlace de la estructura objetivo de aptámero a oligonucleótidos que están contenidos en amplificados del conjunto/de la copia del conjunto,
- 20 g) La puesta en contacto del conjunto contenido en f) o de la copia del conjunto con un oligonucleótido puro según su clase a partir de e) y la unión del oligonucleótido a una o varias estructuras objetivo de aptámero, que ya está/están unida(s) al conjunto,
- h) El análisis que verifica a qué estructura(s) objetivo de aptámero en el conjunto se ha unido el oligonucleótido puro según su clase, y la asignación de la estructura objetivo al oligonucleótido del conjunto al que se ha unido éste, y su identificación de emplazamiento específica en el conjunto,
- 25 i) Opcionalmente la repetición simple o múltiple de pasos g) y h).

Este procedimiento se denomina también "agrupación de epítomos". En este procedimiento se lleva a cabo un ensayo tipo sandwich con aptámeros. Se identifican dos aptámeros que se unen al objetivo en diferentes grupos funcionales ("epítomos").

30 Mediante la representación de todos los aptámeros potencialmente enlazantes en una superficie es posible encontrar selectivamente pares de aptámeros que enlazan el objetivo con diferentes grupos funcionales en cada caso. Estos aptámeros se pueden aplicar entonces en un ensayo tipo sandwich. Los métodos previos no permiten tal análisis altamente paralelo de pares de enlace.

La mezcla de oligonucleótidos empleada en el paso b) se puede obtener mediante una recuperación a partir de una copia de aptámero, como se describe anteriormente.

35 Un control de enlace por medio de la técnica iRIfS descrita anteriormente es ventajoso pero no imprescindible. A tal efecto, el conjunto (con el aptámero inmovilizado) o la copia del mismo se incuban primeramente con el objetivo, de modo que se forma un complejo aptámero-objetivo. Por medio de iRIfS se pueden identificar todos los enlazantes. Ahora se apila este conjunto con una reserva de aptámeros, preferentemente de una recuperación. En los puntos del complejo aptámero-objetivo en los que está aún presente un grupo funcional se pueden unir aptámeros apropiados de la reserva como aptámeros secundarios. Por medio de iRIfS se puede determinar la unión de aptámeros secundarios. Después se lava la superficie para eliminar los no enlazantes. Los aptámeros secundarios se liberan ahora en un paso de elución y se someten de nuevo a una secuenciación. Por consiguiente, se cuenta con todas las secuencias de aptámeros primarios y las secuencias de aptámeros secundarios. Las respectivas secuencias de aptámeros secundarios se producen por separado. Ahora se incuban de nuevo un conjunto copiado con el objetivo, y se incuban con los aptámeros secundarios. De este modo es posible encontrar el aptámero primario adecuado correspondientemente a cada aptámero secundario, y derivar del mismo un par de enlace para el objetivo. Por medio de iRIfS se pueden analizar a su vez cinética o comportamiento bajo diferentes condiciones, y seleccionar de nuevo pares de aptámeros con propiedades deseadas de este modo.

Conjuntos y sus empleos, dispositivo

50 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un conjunto descrito anteriormente, constituido por amplificados que contienen respectivamente una clase de oligonucleótidos, o una copia de un conjunto de amplificados, que contienen respectivamente una clase de oligonucleótidos, obtenible según los procedimientos descritos anteriormente, siendo los oligonucleótidos aptámeros. Los oligonucleótidos presentan en especial una o varias zonas y regiones de cebador variables, como se ha descrito ya anteriormente por medio del procedimiento según la invención.

Otros aspectos de la divulgación se refieren al empleo de tal conjunto o a una copia de tal conjunto para el análisis de las propiedades de enlace de aptámeros a una estructura objetivo de aptámero, para la identificación de aptámeros para una estructura objetivo predeterminada o para la identificación de pares de enlace de aptámero que se unen a diversos puntos de una estructura objetivo de aptámero predeterminada. En esta descripción se indicaron anteriormente procedimientos para la identificación de aptámeros y de pares de enlace de aptámero.

Finalmente, la divulgación se refiere también a un dispositivo para la obtención de aptámeros, que comprende

- Una instalación para la puesta en contacto de una mezcla de oligonucleótidos con una estructura objetivo de aptámero, y para la unión de al menos una parte de oligonucleótidos a la estructura objetivo,
- Una instalación para la separación de oligonucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero de la estructura objetivo de aptámero y de oligonucleótidos no unidos a la estructura objetivo de aptámero,
- Una instalación para la amplificación separada espacialmente de oligonucleótidos aislados que se han unido a la estructura objetivo de aptámero, y para la obtención de varios amplificados separados espacialmente, conteniendo cada amplificado predominantemente una clase de oligonucleótidos,
- Una instalación para la asignación de una identificación específica a varios de los amplificados separados espacialmente, de modo que cualquiera de los amplificados caracterizados es identificable claramente por medio de su identificación específica,
- Una instalación para la secuenciación de oligonucleótidos en varios amplificados caracterizados y una instalación para la asignación de la identificación específica para un amplificado a la secuencia de la clase de oligonucleótidos en el amplificado,
- Una instalación para el análisis de las propiedades de enlace de clases de oligonucleótidos a la estructura objetivo de aptámero, y la asignación de las propiedades de enlace analizadas a las identificaciones específicas de amplificados y las secuencias de las clases de oligonucleótidos.

Además, el dispositivo puede estar configurado y presentar dispositivos tales que éste sea apropiado para la puesta en práctica de todas las formas de realización y pasos complementarios del procedimiento descritos anteriormente. Anteriormente se explicaron ejemplos de realización de procedimientos según la invención. Los ejemplos de realización de dispositivos correspondientes, o bien instalaciones para implementar los pasos de procedimiento según la invención, resultan de la descripción, o son evidentes para los expertos. De este modo, no se requiere explicar adicionalmente que un dispositivo puede presentar instalaciones de manejo apropiadas para posicionar las entidades físicas, por ejemplo los diferentes conjuntos, soportes o sustratos, en caso necesario. Además, no se requiere explicar que pueden estar previstos dispositivos de lógica fluidica apropiados para poner a disposición los respectivos líquidos, o bien medios, en las posiciones necesarias. Además, para los expertos es evidente que puede estar previsto un correspondiente control para controlar el dispositivo, con el fin de realizar el procedimiento según la invención. Pueden estar igualmente previstos dispositivos para la generación de un entorno necesario para la puesta en práctica del procedimiento, a modo de ejemplo indicadores de temperatura.

La invención se describe a continuación por medio de ejemplos de realización.

1. Descripción del procedimiento

A continuación se explica un ejemplo de un procedimiento preferente por medio de la Fig. 1.

- Preparación: diseño de la biblioteca de oligonucleótidos:

Preferentemente se diseña una biblioteca de oligonucleótidos que sea compatible con una secuenciación de siguiente generación (NGS). Las regiones de cebador de la biblioteca se seleccionan compatibles para la secuenciación (NGS) con el fin de introducir oligonucleótidos de ss-ADN que se unen al objetivo directamente en el proceso de secuenciación por medio de NGS. Esta biblioteca de oligonucleótidos se puede emplear para diferentes procedimientos (por ejemplo para diferentes objetivos).

- Selección de aptámeros para objetivo inmovilizado

Se pone en contacto una biblioteca de oligonucleótidos 1, constituida por $\sim 10^{15}$ moléculas de ssADN diferentes, con un objetivo 2, que se presenta inmovilizado en una perla objetivo 3, en un punto de enlace 4. De este modo se pueden unir oligonucleótidos individuales a la molécula objetivo y, de este modo, a las perlas objetivo 3. Mediante un paso de lavado 5 se eliminan los oligonucleótidos 1', que se han unido apenas, o no se han unido en absoluto a moléculas objetivo. Alternativamente a una biblioteca de oligonucleótidos de ssADN se puede emplear una biblioteca de oligonucleótidos de ARN.

- Elución de oligonucleótidos enlazados del objetivo

Los oligonucleótidos enlazados remanentes se liberan de su enlace con el objetivo y, de este modo, de las perlas objetivo 3 mediante un paso de elución apropiado 6.

- Generación de perlas de oligonucleótido por medio de PCR en emulsión

5 Los oligonucleótidos eluidos 7 se someten a una PCR en emulsión 9. En primer lugar se copia exactamente sobre una perla 10, y a continuación se reproduce cada uno de los oligonucleótidos. Una perla 10 porta el oligonucleótido 7a, una perla adicional 10 porta el oligonucleótido 7b, una perla 10 adicional porta el oligonucleótido 7c, y otra perla adicional 10 porta el oligonucleótido 7d. Las perlas portan secuencias de adaptador unidas mediante enlace covalente (no mostradas), que son idénticas en todas las perlas, y a las que se unen los oligonucleótidos por medio de apareamiento de bases. En la representación seleccionada, dos perlas 10 portan el oligonucleótido 7d, que
10 estaba presente en la reserva reiteradamente. Es decisivo que cada perla 10 porte solo un determinado oligonucleótido. Por medio de una emulsión en aceite se consigue que se incluya respectivamente una hebra de oligonucleótido y una perla. Tras la PCR, cada perla 10 porta 10 millones de copias exactamente de un oligonucleótido, mostrándose cuatro a seis copias exactamente de un oligonucleótido por cada perla 10 en la
15 representación esquemática seleccionada en este caso. Se produce una reserva de perlas de oligonucleótido 10. De este modo, el ADN se puede reproducir millones de veces en la perla. Si se emplea una biblioteca de oligonucleótidos de ARN, se lleva a cabo una PCR en emulsión de transcriptasa inversa. Según perla empleada, en la perla se puede alojar opcionalmente un cebador directo o inverso. En el caso de un 454 de Roche se trata del adaptador de secuencia A, o bien B.

20 En la forma de realización mostrada se llevan a cabo un paso de enlace opcional adicional 11 y un paso de selección 8 (selección de reserva). En el paso de enlace 11 se añade a las perlas 10 el objetivo 2 disuelto con los oligonucleótidos 7, que porta un marcador fluorescente 12. El objetivo marcado se une solo a una parte de oligonucleótidos, en la representación del principio aquí seleccionada al oligonucleótido 7b, 7c y 7d, pero no a 7a. En el paso de selección 8 se seleccionan las perlas 10 con los oligonucleótidos 7b, 7c y 7d y el objetivo enlazado 2.

- Secuenciación de perlas de oligonucleótido

25 Las perlas de oligonucleótido seleccionadas con los oligonucleótidos 7b, 7c y 7d se alimentan a un proceso de secuenciación de siguiente generación. Para la secuenciación se introducen las perlas con perlas menores adicionales (no mostradas) en las cavidades 15 de una placa con micropocillos 14, en este caso denominada chip, en el paso de carga 13. Las perlas pequeñas portan un sistema enzimático, que genera luz en la incorporación de componentes de ADN en el siguiente paso de secuenciación 16. En este caso, la señal lumínica es cuantitativa
30 respecto al número de componentes de ADN incorporados. El chip 14 se asemeja a un panal en ampliación. Cada célula del panal es una cavidad 15, que está acoplada con una fibra luminosa (no mostrada, diámetro ~ 45 µm), que contiene una perla con oligonucleótido. En resultado se obtienen las secuencias de todos los oligonucleótidos de la reserva seleccionada en el paso de selección 8.

35 En el caso de la técnica de secuenciación de rendimiento elevado se trata de una técnica de secuenciación de siguiente generación, en este caso un secuenciador 454 (Roche). Alternativamente, se pueden emplear otros secuenciadores, como los de Illumina, Solexa, Solid, Ion Torrent, ABI etc.

- Copia de oligonucleótidos del chip de secuenciación para dar un conjunto de oligonucleótidos

40 Por medio de la técnica de copia de ADN-a-ADN, los oligonucleótidos de la reserva seleccionada se copian sobre un soporte plano 18 a partir del chip de secuenciación en forma de un conjunto 20 en un paso de copia 17. El conjunto 20 sobre el soporte 18 contiene todos los oligonucleótidos secuenciados, en este caso por ejemplo 7b, 7c, 7d. De este modo se pueden generar hasta 10⁶ puntos (signo de referencia 19) con ADN, en primer lugar de hebra doble. Mediante pasos de elaboración correspondientes se produce ss-ADN y, de este modo, ADN funcional para un enlace con el objetivo, portando cada punto 19 las secuencias unitarias de un oligonucleótido seleccionado. El paso de copia se explica más detalladamente a continuación por medio de las Fig. 2-5.

45 - Medida y análisis del conjunto obtenido

A continuación se efectúa en 21 un análisis del enlace de todos los oligonucleótidos del conjunto 20 para el correspondiente objetivo. Para una primera descripción, la medición se puede llevar a cabo, a modo de ejemplo, con un objetivo fluorescente. Los aptámeros enlazantes son identificables entonces mediante su fluorescencia elevada.

50 En la forma de realización preferente, la detección de enlace se efectúa por medio de la técnica iRIfS explicada en la descripción general, cuya puesta en práctica se describe en C. Hanel et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (2002) 91-100, J. Piehler et al. *Analytical Biochemistry*, 249 (1997) 94-102y el documentoUS2010297671. Con ello se puede verificar sin etiqueta y en tiempo real si, y en qué intensidad y con qué parámetros cinéticos tiene lugar una interacción entre las moléculas objetivo y cada punto de ADN separado. La cinética de enlace y las constantes

de afinidad de todos los aptámeros en el conjunto se determinan paralelamente. Además se pueden efectuar investigaciones paralelas de la afinidad con el objetivo bajo diferentes condiciones (temperatura, pH, contenido en sales, etc.) y de la especificidad, analizándose simultáneamente hasta 10⁶ puntos de ADN en el conjunto.

- Asignación de las secuencias de aptámeros

5 Las constantes de afinidad de los oligonucleótidos separados se valoran de manera comparativa. Los aptámeros son aquellos nucleótidos con las máximas afinidades con el objetivo. Sus secuencias se pueden extraer inmediatamente de los resultados del paso de secuenciación 16, ya que mediante la técnica de copia ADN-a-ADN en el paso 17 se garantiza que los puntos de aptámero 19 del conjunto de aptámeros 20 se encuentran en las mismas posiciones que en el chip de secuenciación 14. Por consiguiente, se da una clara asignación entre enlace y
10 secuencia.

2. Paso de copia

El paso de copia 17 empleado en el anterior ejemplo se explica más detalladamente por medio de otros ejemplos de realización a) y b) en base a las Fig. 2A-2D, 3, 4 y 5.

Ejemplo de realización a) (Fig. 2A-2D, 3, 4)

15 Los signos de referencia para objetos idénticos se seleccionan como en la Fig. 1.

El chip de secuenciación 14 presenta una pluralidad de microcavidades 15. En la Fig. 3 se muestra una vista superior esquemática de un corte del chip secuenciador 14 (primer soporte) con las microcavidades 15. Las microcavidades pueden presentar, a modo de ejemplo, una medida de 44 µm, como se muestra en la Fig. 3. El chip secuenciador puede ser, a modo de ejemplo, un chip secuenciador (GS Titanium 2005 y GS FLX Titanium 2008) del
20 secuenciador 454 de la firma Roche.

En todas las cavidades 15 se deposita una partícula 10, portando cada una de estas partículas millones de copias de un oligonucleótido 7b, 7c, 7d (vgl. Fig. 1), 7e (no mostrado en la Fig. 1). La variedad de copias se obtiene mediante una PCR en emulsión, que es una amplificación separada espacialmente y se explicó por medio del anterior ejemplo. En la Fig. 4 se muestra una representación en sección transversal esquemática del chip
25 secuenciador 14 con las cavidades 15, en el que se introducen las partículas 10 con los oligonucleótidos 7b, 7c, 7d, 7e.

En el ejemplo de realización representado en las Fig. 2 a Fig. 4, este chip se emplea como conjunto principal para la producción de una copia. Se deben copiar los oligonucleótidos de las cavidades 15. Con este fin, las cavidades se
30 rellenan primeramente con un medio de amplificación, a modo de ejemplo una mezcla de PCR. Como se muestra en la Fig. 2b, a continuación se aplica un soporte 18 (segundo soporte), que cierra las cavidades 15 y porta adaptadores de enlace adecuados para el medio de amplificación, que se muestran esquemáticamente como puntos 22 en 2b. Por lo tanto, tras el cierre de las cavidades 15 por medio de la tapa 18, para cada muestra, es decir, cada partícula 10 con hebras de ADN unidas a la misma 7b, 7c, 7d, 7e se ha generado una zona de amplificación limitada espacialmente 24, que está separada de las zonas de amplificación 24 de las demás muestras. Los adaptadores de
35 enlace 22 limitan con estas zonas de amplificación 24. En este ejemplo, los adaptadores de enlace 22 son cebadores, que hibridan con las contrahebras para dar los oligonucleótidos 7b, 7c, 7d, 7e. Estos cebadores 22 son también puntos de enlace para la ADN-polimerasa. La Fig. 2b muestra ya el estado tras el paso de amplificación (en este caso el segundo paso de amplificación una vez ya efectuada la PCR en emulsión, en la que se obtuvieron perlas con una variedad de oligonucleótidos, véase anteriormente), en el que se producen contrahebras complementarias 7b', 7c', 7d', 7e' de los oligonucleótidos 7b, 7c, 7d, 7e. Estas contrahebras se representan en la Fig. 2b como líneas discontinuas 7. Las contrahebras 7b', 7c', 7d', 7e' constituyen una copia negativa de los oligonucleótidos.

A continuación se liberan de las partículas 10 las copias negativas creadas 7b', 7c', 7d', 7e' de los oligonucleótidos, lo que se puede efectuar, a modo de ejemplo, mediante calentamiento del chip secuenciador y, por consiguiente, de
45 las cavidades en las que están dispuestas. A continuación, las copias liberadas 7b', 7c', 7d', 7e' hibridan con los adaptadores de enlace 22, lo que se puede favorecer, a modo de ejemplo, mediante enfriamiento del chip secuenciador. El resultado del depósito de las copias 7b', 7c', 7d', 7e' en el adaptador de enlace 22 y, por consiguiente, el soporte 18, se representa en la Fig. 2c. En este paso de transferencia de copias negativas al soporte 18 se mantiene la información de emplazamiento, o bien el registro, ya que para cada muestra está prevista una
50 zona de amplificación 24 limitada espacialmente, y las zonas de amplificación 24 están separadas entre sí.

A continuación se elimina el soporte 18 con las copias negativas unidas al mismo 7b', 7c', 7d', 7e' del chip secuenciador 14, y éste contiene una copia negativa del conjunto de nucleótidos 7b, 7c, 7d, 7e en las cavidades 15 del chip secuenciador 14. El soporte 18 con las copias negativas 7b', 7c', 7d', 7e' se puede someter a un paso de

amplificación adicional para obtener de nuevo copias positivas 7b, 7c, 7d, 7e, que se obtienen mediante prolongación del cebador 22. Tal procedimiento se muestra en el siguiente ejemplo b).

5 Las partículas 10 con los oligonucleótidos 7b, 7c, 7d, 7e permanecen en las cavidades 15, de modo que éstas pueden servir de nuevo como conjunto primario para un nuevo proceso de copia con un nuevo soporte. Por consiguiente, se puede elaborar un número de copias casi arbitrario.

Para preparar de nuevo el conjunto principal (el chip secuenciador 14) para un ciclo de copia ulterior tras el proceso de copia, el medio de amplificación se puede sustituir o eliminar en las cavidades, a modo de ejemplo la mezcla de PCR.

Ejemplo de realización b) (Fig. 5)

- 10 Las perlas 10 portan respectivamente diferentes oligonucleótidos, pero con las mismas secuencias terminales. Se muestra el proceso por medio del oligonucleótido 7b. Las cavidades se rellenan con mezcla de PCR, que contiene cebador soluble 30 (b) y se cierran con una tapa 18 (segundo soporte) (c), que porta una molécula de adaptador 22 (cebador fijado). Las enzimas de la mezcla de PCR generan en el paso (d) primeramente una copia negativa 7b' del oligonucleótido 7b sobre la perla, que se libera mediante calentamiento (e). Mediante un proceso de enfriamiento (f),
- 15 la copia negativa 7b' se une al adaptador de enlace 22 de la copia, y las enzimas generan en el paso (g) una copia negativa 7b de la copia negativa unida sólidamente, es decir, una copia positiva 7b del oligonucleótido original 7b. Al final del proceso se retira la tapa 18, sobre la que se encuentra ahora una copia (h) del conjunto (i). Las copias negativas no unidas mediante enlace covalente 7b', 7c', 7d', 7e' se pueden eliminar en un paso de lavado (no mostrado). Después se emplea la copia del conjunto sobre el soporte 18 para ensayos de enlace con el objetivo.
- 20 La alimentación (i) no se consume en este caso, se puede lavar y cargar de nuevo con una mezcla de PCR y reutilizar, por ejemplo para la repetición del proceso y la producción de copias adicionales.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la identificación de aptámeros, que comprende

- La puesta en contacto de una mezcla de oligonucleótidos con una estructura objetivo de aptámero, y el enlace de al menos una parte de los oligonucleótidos a la estructura objetivo,
- La separación de oligonucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero, de la estructura objetivo de aptámero y de oligonucleótidos no unidos a la estructura objetivo de aptámero,
- La amplificación separada espacialmente de todos los nucleótidos que se han unido a la estructura objetivo de aptámero, y la generación de amplificadores separados espacialmente para cada oligonucleótido, conteniendo cada amplificado predominantemente una clase de oligonucleótidos,
- La asignación de una identificación de emplazamiento específica en cada amplificado separado espacialmente, de modo que cada uno de los amplificadores caracterizados es identificable claramente por medio de su identificación de emplazamiento específica,
- La secuenciación de oligonucleótidos de los amplificadores caracterizados y la asignación de la identificación de emplazamiento específica para el amplificado respecto a la secuencia de la clase de oligonucleótidos en el amplificado,
- Producción de un conjunto de amplificadores, aplicándose los oligonucleótidos amplificadores al menos en un primer soporte, de modo que el conjunto comprende puntos aislados con secuencias uniformes para cada oligonucleótido seleccionado,
- El análisis de las propiedades de enlace de todas las clases de oligonucleótidos asignados a los amplificadores en el ensayo en la estructura objetivo de aptámero, y la asignación de las propiedades de enlace analizadas a las identificaciones de emplazamiento específicas de los amplificadores y las secuencias de las correspondientes clases de oligonucleótidos,
- Poniéndose en contacto el conjunto de amplificadores con la estructura objetivo de aptámero para el análisis de las propiedades de enlace.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la amplificación separada espacialmente es una amplificación en una emulsión, una amplificación digital o una amplificación en una fase sólida, y/o en el que la identificación de emplazamiento específica es una identificación detectable por vía óptica, espectroscópica o radioactiva.

3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende la unión de oligonucleótidos a partículas de fase sólida antes de, durante o tras la amplificación separada espacialmente, obteniéndose partículas de fase sólida a las que está unido respectivamente solo un amplificado con una clase de oligonucleótidos, o que comprende la unión de oligonucleótidos antes de, durante o tras la amplificación separada espacialmente a partículas de fase sólida, obteniéndose partículas de fase sólida a las que está unido respectivamente solo un amplificado con una clase de oligonucleótidos, que comprende adicionalmente

- La puesta en contacto de partículas de fase sólida, a las que está unido respectivamente un amplificado con una clase de oligonucleótidos, con estructura objetivo de aptámero,
- La determinación de un resultado de enlace positivo o negativo de la estructura objetivo de aptámero en oligonucleótidos del amplificado, que está unido a una partícula de fase sólida,
- La selección de partículas de fase sólida en las que es verificable un resultado de enlace positivo.

4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-3, que comprende

- La generación de una copia o de un derivado del conjunto de amplificadores con, sobre o en un segundo soporte, asignándose a cada amplificado de la copia o del derivado una identificación de emplazamiento específica,
- La puesta en contacto de la copia o del derivado del conjunto con la estructura objetivo del aptámero para el análisis de las propiedades de enlace.

5.- Procedimiento según la reivindicación 4, presentando el segundo soporte un adaptador de enlace para oligonucleótidos de los amplificadores o propiedades de enlace para oligonucleótidos de los amplificadores, y generándose la copia uniéndose oligonucleótidos de los amplificadores al soporte por medio del adaptador de enlace o las propiedades de enlace.

6.- Procedimiento según la reivindicación 5, que comprende

- La puesta a disposición de al menos una zona de medio de amplificación limitada espacialmente para cada oligonucleótido, que está separado de las zonas de medio de amplificación de los demás oligonucleótidos, limitando una superficie del segundo soporte, provista del adaptador de enlace o de propiedades de enlace, con las zonas de medio de amplificación,
- La amplificación de oligonucleótidos a través de medios de amplificación en las zonas de medio de

- amplificación para la generación de amplificadores de los oligonucleótidos,
- La unión de hebras simples de amplificadores o derivados de amplificadores al segundo soporte por medio del adaptador de enlace o de las propiedades de enlace, de modo que una disposición espacial de las hebras simples en el segundo soporte corresponde a la disposición espacial de los amplificadores en el conjunto del que proceden las hebras simples; y
 - La eliminación del segundo soporte con las hebras simples enlazadas del conjunto.
- 5
- 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la unión de las copias o los derivados al segundo soporte se efectúa al mismo tiempo que la amplificación.
- 10
- 8.- Procedimiento según la reivindicación 6 o 7, en el que las zonas de medio de amplificación limitadas espacialmente están definidas al menos parcialmente por micro- o nanoestructuras en el primer soporte que porta el conjunto, o en el segundo soporte, que porta la copia o el derivado.
- 15
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 6 o 7, en el que las zonas de medio de amplificación limitadas espacialmente están separadas al menos parcialmente mediante límites de fase entre dos líquidos, un líquido y un gas, o un límite físico.
- 20
- 10.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la generación de al menos una zona de medio de amplificación limitada espacialmente presenta una puesta a disposición del segundo soporte con al menos una cavidad asignada a cada oligonucleótido, en el que está dispuesto el adaptador de enlace, una introducción del medio de amplificación en las cavidades y un cierre de las cavidades por medio del primer soporte, de modo que los oligonucleótidos están expuestos a la zona de medio de amplificación, o
- 25
- En el que la generación de al menos una zona de medio de amplificación limitada espacialmente para cada oligonucleótido presenta una puesta a disposición de los oligonucleótidos en cavidades separadas, asignadas respectivamente, en el primer soporte que porta el conjunto, una introducción del medio de amplificación en las cavidades y un cierre de las cavidades mediante el segundo soporte.
- 30
- 11.- Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, que comprende la recuperación de una o varias clases de oligonucleótidos mediante liberación de los oligonucleótidos del primer soporte, del segundo soporte y/o de copias de estos soportes, o
- Que comprende la producción de oligonucleótidos adicionales mediante amplificación de oligonucleótidos, que están unidos al primer soporte, al segundo soporte y/o a copias de este soporte.
- 35
- 12.- Procedimiento para la identificación de pares de enlace de aptámero, que se unen a diversos puntos de una estructura objetivo de aptámero, que comprende los pasos del procedimiento según una de las reivindicaciones 1-8, y comprende además:
- a) La puesta en contacto del conjunto de amplificadores o de la copia del conjunto de amplificadores, como se obtiene a partir de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1-9, con la estructura objetivo de aptámero y unión de la estructura objetivo de aptámero a oligonucleótidos, que están contenidos en los amplificadores del conjunto/de la copia del conjunto,
 - b) La puesta en contacto del conjunto contenido en a) o de la copia del conjunto con una mezcla de oligonucleótidos, y la unión de al menos una parte de oligonucleótidos a la estructura objetivo de aptámero, que ya está unida al conjunto,
 - c) Diferenciándose los respectivos puntos de enlace de los oligonucleótidos enlazantes de la mezcla de los puntos de enlace de los oligonucleótidos que se encuentran en el conjunto, que se unen respectivamente a la misma estructura objetivo,
 - d) La elución de oligonucleótidos que no se han unido a la estructura objetivo de aptámero en b),
 - e) La eliminación de oligonucleótidos unidos en b) de la estructura objetivo de aptámero,
 - f) La secuenciación de oligonucleótidos contenidos en d), y la producción o aislamiento de oligonucleótidos en forma pura según su clase,
 - g) La puesta en contacto de un conjunto de amplificadores o de la copia del conjunto de amplificadores, como se obtiene a partir de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1-8, con la estructura objetivo de aptámero, y enlace de la estructura objetivo de aptámero a oligonucleótidos que están contenidos en amplificadores del conjunto/de la copia del conjunto,
 - h) La puesta en contacto del conjunto contenido en f) o de la copia del conjunto con un oligonucleótido puro según su clase a partir de e) y la unión del oligonucleótido a una o varias estructuras objetivo de aptámero, que ya está/están unida(s) al conjunto,
 - i) El análisis que verifica a qué estructura(s) objetivo de aptámero en el conjunto se ha unido el oligonucleótido puro según su clase, y la asignación de la estructura objetivo al oligonucleótido del conjunto al que se ha unido éste, y su identificación de emplazamiento específica en el conjunto,
- 55

- j) Opcionalmente la repetición simple o múltiple de pasos g) y h).

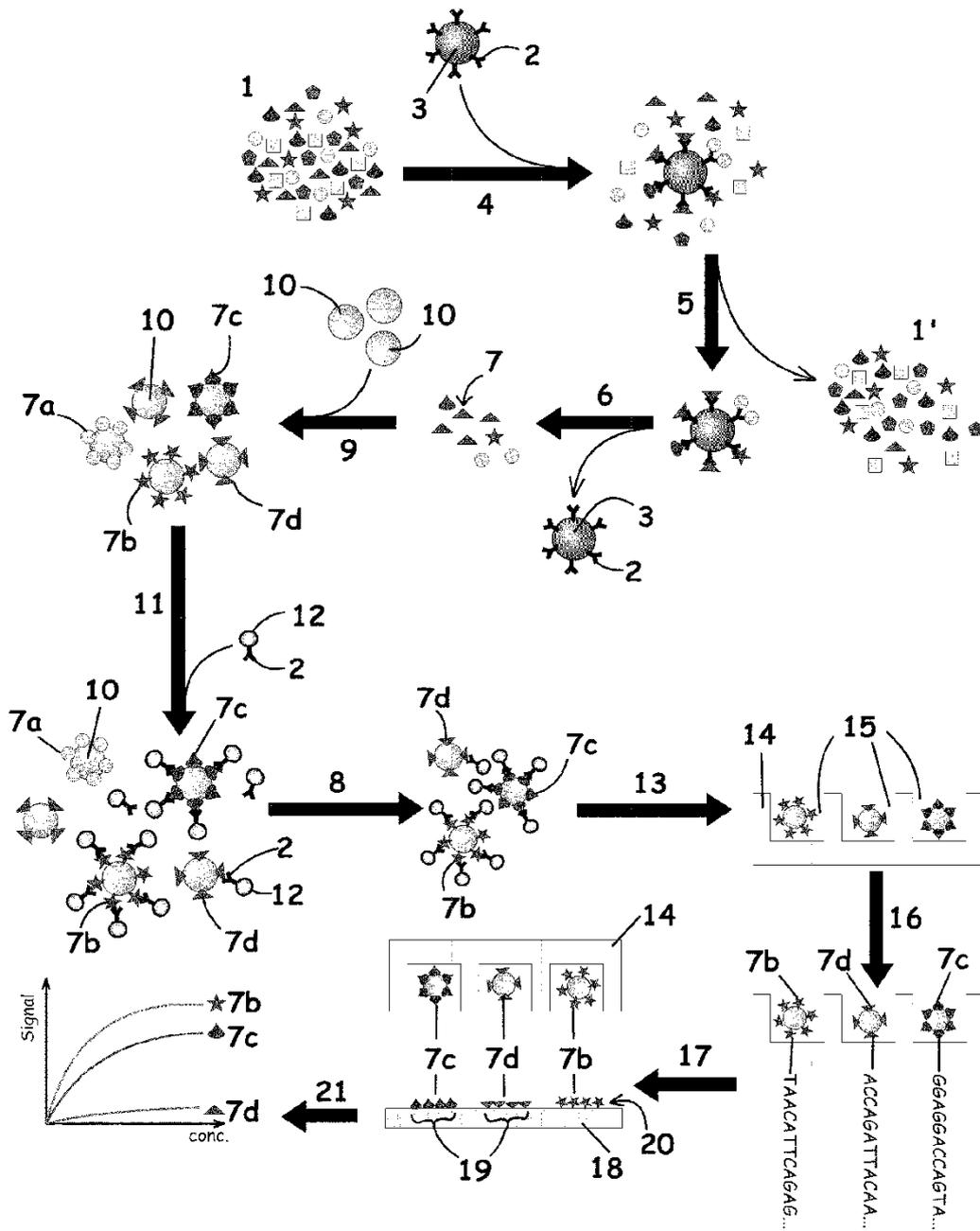


Fig. 1

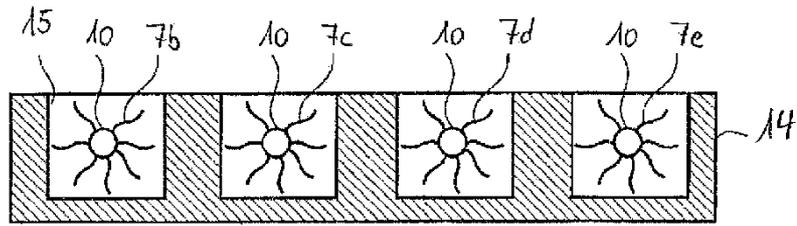


FIG. 2A

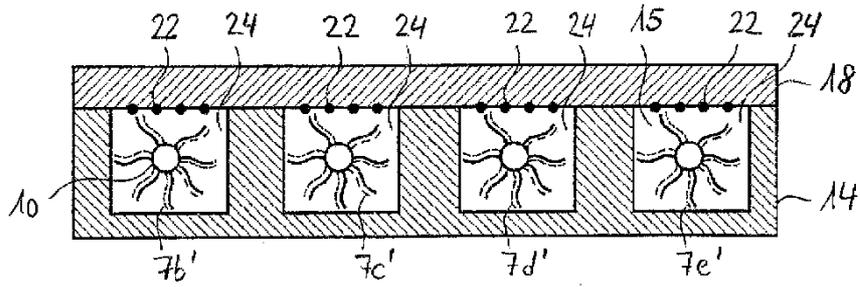


FIG. 2B

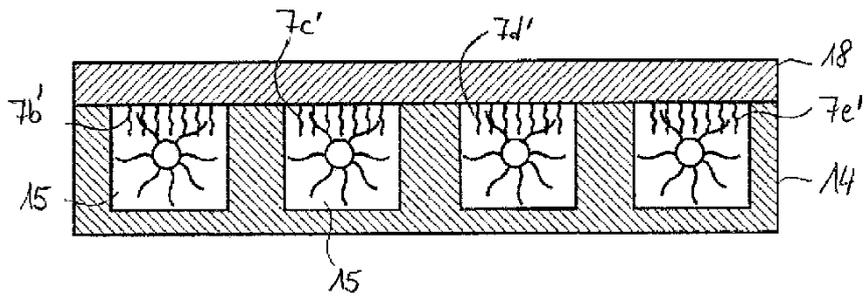


FIG. 2C

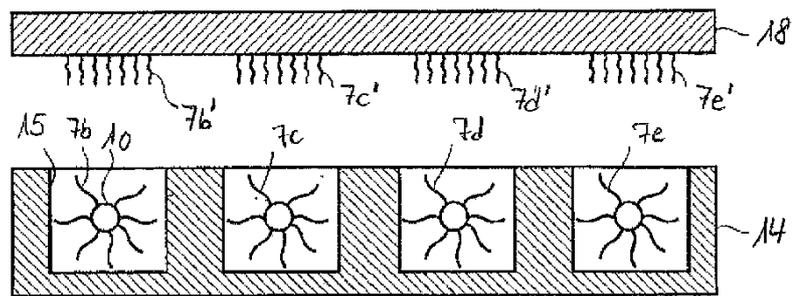


FIG. 2D

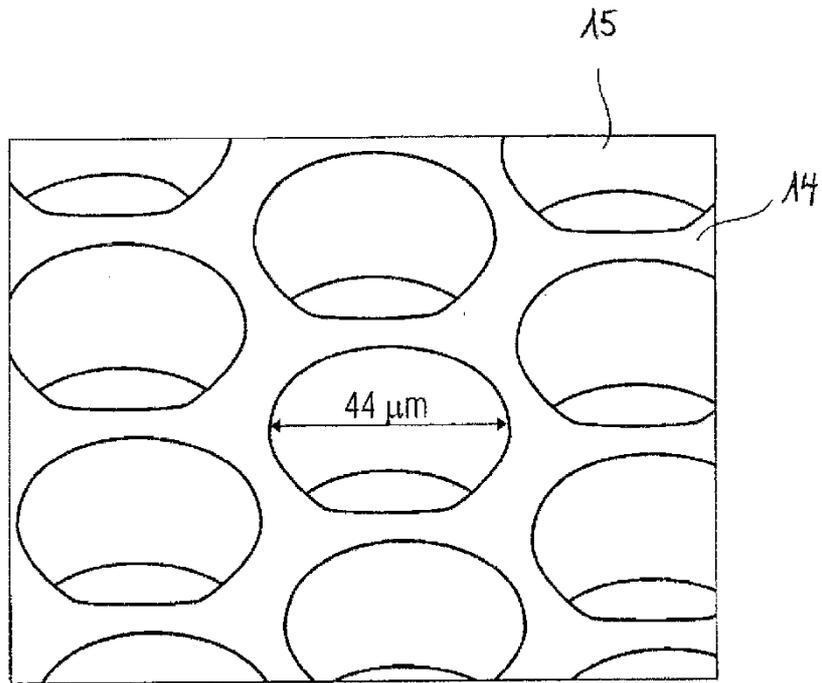


FIG. 3

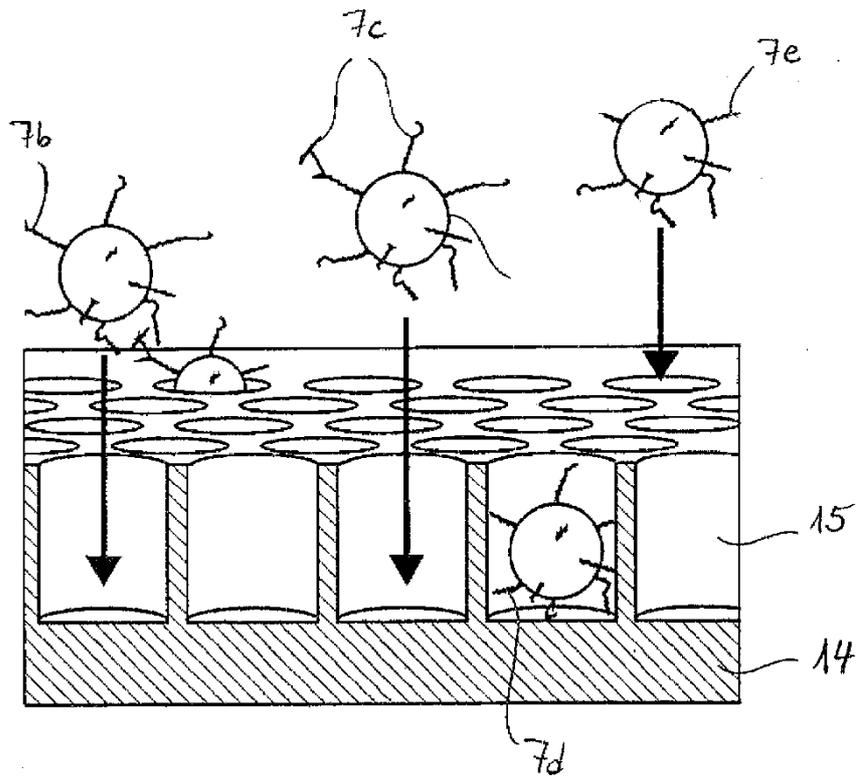


FIG. 4

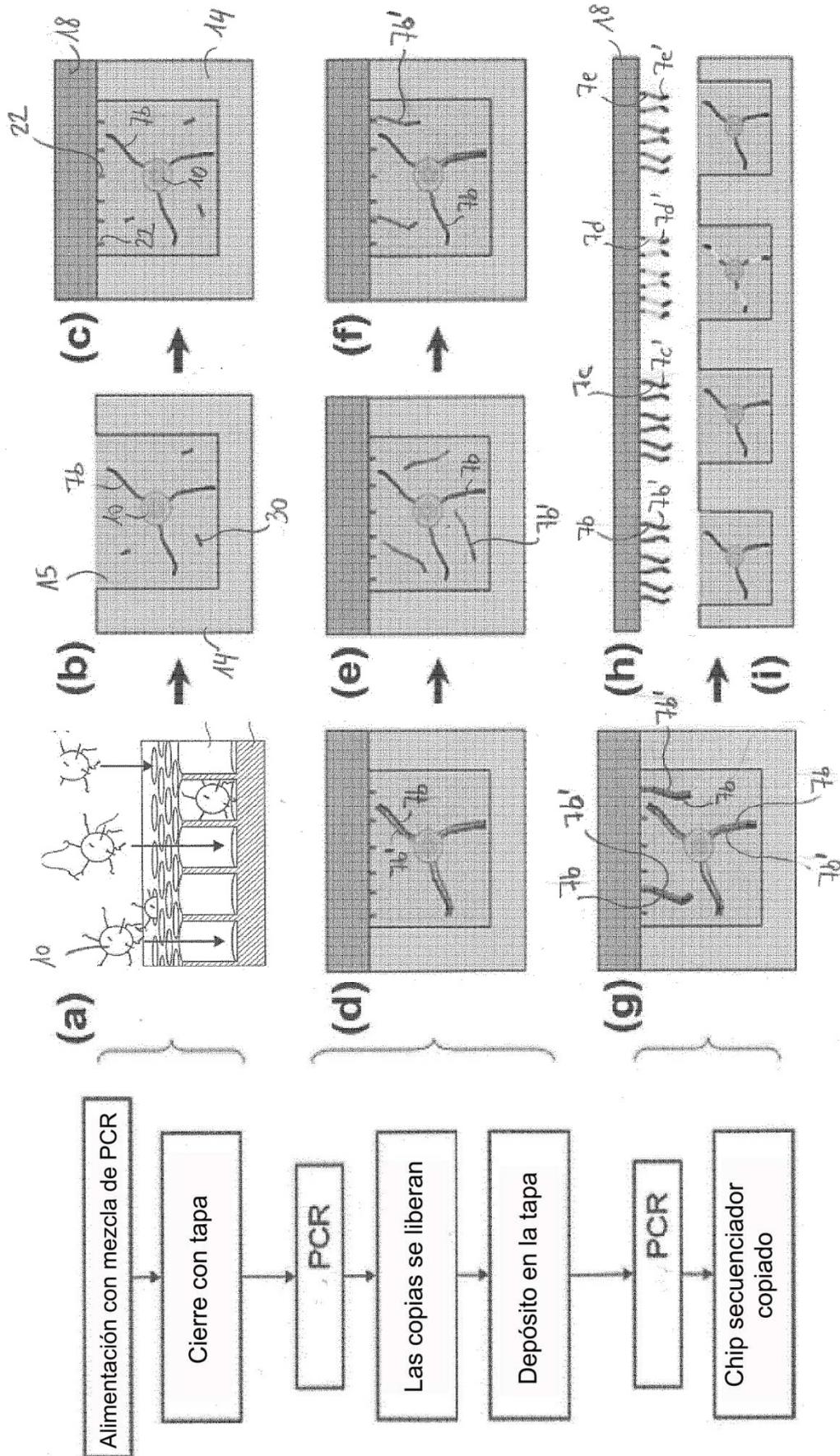


Fig. 5