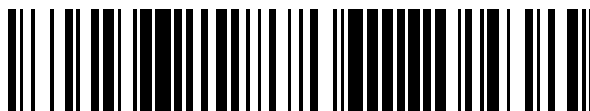


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 727**

51 Int. Cl.:

C40B 30/04 (2006.01)

C40B 40/06 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2015 PCT/US2015/015979**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15126769**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2015 E 15751799 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3108045**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección de microorganismos**

30 Prioridad:

18.02.2014 US 201461940955 P

04.03.2014 US 201461947627 P

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

04.04.2019

73 Titular/es:

SOMALOGIC, INC. (100.0%)

2945 Wilderness Place

Boulder, CO 80301, US

72 Inventor/es:

OCHSNER, URS A. y

JANJIC, NEBOJSA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 707 727 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

Composiciones y métodos para la detección de microorganismos

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere en general a composición y métodos para la detección de la presencia de un microorganismo en una muestra. Más específicamente, la divulgación se refiere a aptámeros de ácido nucleico capaces de unir proteína de microorganismo y métodos para la captura y detección de un microorganismo con aptámeros de ácido nucleico en una muestra. El alcance de protección se define por las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes

La contaminación de agua y alimentos supone un grave riesgo de salud tanto en países desarrollados como en países del tercer mundo y se piensa que es la responsable de millones de fallecimientos y enfermedades de seres humanos anualmente. Además, la contaminación de agua y alimentos también amenaza la salud de los animales, incluidos ganado y ecosistemas acuáticos.

En general, estas enfermedades son causadas por contaminación por microorganismos, tales como bacterias, parásitos o virus. Con respecto a la producción alimentaria, la complejidad y el número de partes implicadas proporciona un número abundante de oportunidades de contaminación no intencionada y la potencial y lamentable interrelación de terrorismo y suministro de alimentos. El agua superficial y subterránea se vuelve contaminada en general por mascotas, ganado o animal salvaje que defeca en o cerca de una fuente de agua, mientras que la escorrentía de vertederos, campos sépticos, alcantarillas y tierras de cultivo también contribuyen en la contaminación del agua. Independientemente del tipo y fuente de contaminación, puede resultar complicado para los individuos determinar si el agua o la comida está contaminada puesto que puede parecer y tener un sabor bueno, pero aún así causa enfermedad y en última instancia la muerte. Por tanto, el control de la contaminación microbiana en alimentos, agua, productos no estériles o el medioambiente es muy importante para la salud pública a nivel mundial.

Por lo tanto, continua siendo una necesidad composiciones alternativas y métodos para un control mejorado, eficaz en costes y eficiente para la contaminación microbiana tanto en alimentos como en agua. La presente divulgación cumple tales necesidades en proporcionar reactivos de aptámeros novedosos con una alta especificidad y afinidad para epítomos de superficie celular sobre un microorganismo para la captura y enriquecimiento de un microorganismo presente en bajas densidades celulares para la detección directa (por ejemplo, mediante qPCR tinción fluorescente) sin la necesidad de cultivo o lisis celular.

Sumario

La intención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación describe la generación de novedosos reactivos de aptámeros modificados con una tasa de disociación lenta (SOMAmer) a varias proteínas asociadas a la superficie celular de *Staphylococcus aureus* a través de SELEX con múltiples bibliotecas de ADN modificadas usando proteínas recombinantes o nativas purificadas. Se obtuvieron agentes de unión de alta afinidad con Kd sub-nanomolares para la proteína A estafilocócica (SpA), factores de aglutinación (ClfA, ClfB), proteínas de unión a la fibronectina (FnbA, FnbB) y determinantes de superficie regulados por hierro (Isd). Se sometieron a ensayo varios aptámeros específicamente unidos a células de *S. aureus* a partir de todas las cepas, pero no a otros estafilococos u otras bacterias. Los aptámeros de SpA y ClfA mostraron ser útiles para la captura selectiva y enriquecimiento de células de *S. aureus* a partir de matrices de baja densidad celular, tal como se muestra mediante cultivo y PCR, conduciendo a límites mejoradas de detección y retirada eficaz de inhibidores de PCR. La detección de células de *S. aureus* se potenció por varias órdenes de magnitud cuando la superficie celular bacteriana se recubrió con aptámeros seguida por qPCR de los aptámeros en comparación con PCR genómica.

La presente divulgación describe un método para detectar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra que comprende: a) poner en contacto la muestra con un primer aptámero para formar una mezcla, en donde el primer aptámero es capaz de unirse a una primera proteína de superficie celular del microorganismo para formar un complejo y comprende un primer marcador, en donde el primer marcador es capaz de unirse a un soporte sólido; b) poner en contacto la mezcla con el soporte sólido en condiciones que permitan que el primer marcador se una al soporte sólido; c) lavar el soporte sólido para enriquecer la mezcla para el complejo y/o lavar el soporte sólido para sustancialmente retirar material no unido; c) poner en contacto la mezcla con un segundo aptámero, en donde el segundo aptámero es capaz de unirse a la primera proteína de superficie celular o una segunda proteína de superficie celular del microorganismo; y d) realizar un ensayo para detectar el segundo aptámero, en donde la detección del segundo aptámero indica que el microorganismo está presente en la muestra y en donde cuando no se detecta el segundo aptámero indica que el microorganismo está ausente en la muestra.

65

La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para detectar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra que comprende:

- 5 a) poner en contacto la muestra con un soporte sólido, en donde un primer aptámero se une al soporte sólido mediante un primer marcador y en donde el primer aptámero es capaz de unirse a una primera superficie celular del microorganismo para formar un complejo;
- b) lavar el soporte sólido para enriquecer la mezcla para el complejo y/o lavar el soporte sólido para sustancialmente retirar material no unido;
- 10 c) poner en contacto la mezcla con un segundo aptámero, en donde el segundo aptámero es capaz de unirse a la primera proteína de superficie celular o una segunda proteína de superficie celular del microorganismo y comprende un segundo marcador; y d) realizar un ensayo para detectar el segundo aptámero, en donde la detección del segundo aptámero indica que el microorganismo está presente en la muestra y en donde cuando no se detecta el segundo aptámero indica que el microorganismo está ausente en la muestra.
- 15 En otro aspecto, el al menos uno del primer aptámero y el segundo aptámero comprende adicionalmente al menos uno de pirimidina modificada en el C-5. En un aspecto relacionado, la pirimidina modificada en el C-5 se selecciona del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (BndC); 5-(N-2-feniletílcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PEdC); 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PPdC); 5-(N-1-naftilmetílcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NapdC); 5-(N-2-naftilmetílcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NapdC); 5-(N-1 -naftil-2-etílcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NEdC); 5-(N-2-naftil-2-etílcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NEdC); 5-(N-bcnílcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (BndU); 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (iBudU); 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-deoxiuridina (TrpdU); cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propil]carboxiamida)-2'-deoxiuridina y 5-(N-naftilmetílcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (NapdU).
- 20
- 25 En otro aspecto, el segundo aptámero es amplificable. En un aspecto relacionado, el segundo aptámero es un modelo para amplificaciones enzimáticas (por ejemplo, mediante PCR o qPCR). En aún otro aspecto relacionado, el segundo aptámero se amplifica por cebadores de PCR que son capaces de hibridarse con el segundo aptámero o una o más regiones del segundo aptámero.
- 30 En otro aspecto, el segundo aptámero comprende un segundo marcador, en donde el segundo marcador se selecciona de entre el grupo que consiste en un tinte, un punto cuántico, un radiomarcador, sitios de cebador de PCR, un grupo funcional electroquímico y una enzima más un sustrato de enzima detectable.
- 35 En otro aspecto, el primer marcador se selecciona de entre el grupo que consiste en un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un anticuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, un ligando, un lípido, biotina, polihistidina o cualquier fragmento o derivado de estas estructuras.
- 40 En otro aspecto, el soporte sólido se selecciona entre el grupo que consiste en una perla y un sustrato. En un aspecto relacionado, la perla se selecciona del grupo que consiste en una perla de polímero, una perla de agarosa, una perla de poliestireno, una perla de acrilamida, una perla de núcleo sólido, una perla porosa, una perla paramagnética, una perla de vidrio, una microperla y una perla de poro controlado. En aún otro aspecto relacionado, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en un pocillo de microtítulos, un sustrato de copolímero de cicloolefina, una membrana, un sustrato de plástico, nailon, una película Langmuir-Blodgett, vidrio, un sustrato de germanio, un sustrato de silicio, un chip oblea de silicio, un chip pasante de flujo, una nanopartícula, un sustrato de politetrafluoroetileno, un sustrato de poliestireno, un sustrato de arseniuro de galio, un sustrato de oro y un sustrato de plata.
- 45
- 50 En otro aspecto, el ensayo se selecciona entre el grupo que incluye, pero sin limitación, PCR, qPCR, espectroscopía de masas, hibridación de secuenciación y similares. En un aspecto relacionado, el ensayo se selecciona entre el grupo que consiste en PCR y qPCR.
- 55 En otro aspecto, el microorganismo se selecciona entre el grupo que incluye, aunque no de forma limitativa a, una célula bacteriana, parásito y virus.
- 60 En otro aspecto, el microorganismo es una célula bacteriana. En un aspecto relacionado, la célula bacteriana es patógena. En aún otro aspecto relacionado, la célula bacteriana es una célula de estafilococos. En otro aspecto relacionado, la célula bacteriana es una célula de *Staphylococcus aureus*.
- En otro aspecto, la primera proteína de superficie celular y la segunda proteína de superficie celular son la misma proteína o una proteína distinta.
- 65 En otro aspecto, la primera proteína de superficie celular es una proteína de superficie celular bacteriana.
- En otro aspecto, la segunda proteína de superficie celular es una proteína de superficie celular bacteriana.

En otro aspecto, la primera proteína de superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en SPA, ClfA, ClfB, FnbA, FnbB, IsdA, IsdB, IsdC, IsdH y SasD. En un aspecto relacionado, la primera proteína de superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en SPA y ClfA.

- 5 En otro aspecto, la segunda proteína de superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en SPA, ClfA, ClfB, FnbA, FnbB, IsdA, IsdB, IsdC, IsdH y SasD. En un aspecto relacionado, la segunda proteína de superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en SPA y ClfA.

10 En otro aspecto, el primer aptámero comprende una molécula de ácido nucleicos que tiene la secuencia de GGCWWCGGGWACCWAWWWAWNGGWWWAGCC(N)_nGWC (SEQ ID NO: 14), en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto relacionado, n es 2. En un aspecto relacionado, el primer aptámero es de al menos aproximadamente 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud. En aún otro aspecto relacionado, el primer aptámero es de aproximadamente 32 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (o 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de longitud).

20 En otro aspecto, el primer aptámero comprende una molécula de ácido nucleicos que tiene la secuencia de AWCWGGWWC(N)_nAWCWGGWWWWWAAG (SEQ ID NO: 15), en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. En un aspecto relacionado, n es de 5 a 20 (o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20). En otro aspecto, n es de 10 a 18 (o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18). En un aspecto relacionado, n es aproximadamente 16. En aún otro aspecto
25 relacionado, el primer aptámero es al menos aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.

30 En otro aspecto, el primer aptámero es de aproximadamente 18 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (o 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de longitud).

35 En otro aspecto, el primer aptámero comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-8 y 10-12, en donde W es una pirimidina modificada en el C-5.

40 En otro aspecto, el segundo aptámero comprende una molécula de ácido nucleicos que tiene la secuencia de GGCWWCGGGWACCWAWWWAWNGGWWWAGCC(N)_nGWC (SEQ ID NO: 14), en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto relacionado, n es 2. En un aspecto relacionado, el segundo aptámero es de al menos aproximadamente 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud. En aún otro aspecto relacionado, el segundo aptámero es de aproximadamente 32 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (o 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de longitud).

45 En otro aspecto, el segundo aptámero comprende una molécula de ácido nucleicos que tiene la secuencia de AWCWGGWWC(N)_nAWCWGGWWWWWAAG (SEQ ID NO: 15), en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. En un aspecto
50 relacionado, n es de 5 a 20 (o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20). En otro aspecto, n es de 10 a 18 (o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18). En un aspecto relacionado, n es aproximadamente 16.

55 En otro aspecto, el segundo aptámero es al menos aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.

60 En otro aspecto, el segundo aptámero es de aproximadamente 18 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (o 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de longitud).

65 En otro aspecto, el segundo aptámero comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-8 y 10-12, en donde W es una pirimidina modificada en el C-5.

En otro aspecto, la pirimidina modificada en el C-5 se selecciona del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (BndC); 5-(N-2-feniletílcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PEdC); 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-

deoxicitidina (PPdC); 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicitidina (NapdC); 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicitidina (2NapdC); 5-(N-1-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicitidina (NEdC); 5-(N-2-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicitidina (2NEdC); 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (BndU); 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (iBudU); 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-deoxiuridina (TrpdU); cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-deoxiuridina y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (NapdU).

En otro aspecto, la muestra se selecciona entre el grupo que incluye, aunque no de forma limitativa, una muestra de agua, una muestra de tierra, una muestra de comida, una muestra de célula, una muestra de cultivo, una muestra de tejido, una muestra de residuos celulares, una muestra biológica y similares.

En otro aspecto y para cualquiera de las realizaciones que se desvelan en el presente documento, la concentración del primer aptámero es de aproximadamente 0.5 nmol l⁻¹ a aproximadamente 60 nmol l⁻¹ (o 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,2, 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33, 33,5, 34, 34,5, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 nmol l⁻¹). En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de aproximadamente 1 nmol l⁻¹ a aproximadamente 40 nmol l⁻¹ (o 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,2, 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33, 33,5, 34, 34,5, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nmol l⁻¹). En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de aproximadamente 2 nmol l⁻¹ a aproximadamente 35 nmol l⁻¹ (o 2, 2,5, 3, 3,2, 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33, 33,5, 34, 34,5 o 35 nmol l⁻¹).

En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 0,5 nmol l⁻¹, 1 nmol l⁻¹, 2 nmol l⁻¹, 3 nmol l⁻¹, 3,2 nmol l⁻¹, 4 nmol l⁻¹, 5 nmol l⁻¹, 6 nmol l⁻¹, 7 nmol l⁻¹, 8 nmol l⁻¹, 9 nmol l⁻¹, 10 nmol l⁻¹, 11 nmol l⁻¹, 12 nmol l⁻¹, 13 nmol l⁻¹, 14 nmol l⁻¹, 15 nmol l⁻¹, 16 nmol l⁻¹, 17 nmol l⁻¹, 18 nmol l⁻¹, 19 nmol l⁻¹, 20 nmol l⁻¹, 21 nmol l⁻¹, 22 nmol l⁻¹, 23 nmol l⁻¹, 24 nmol l⁻¹, 25 nmol l⁻¹, 26 nmol l⁻¹, 27 nmol l⁻¹, 28 nmol l⁻¹, 29 nmol l⁻¹, 30 nmol l⁻¹, 31 nmol l⁻¹, 32 nmol l⁻¹, 33 nmol l⁻¹, 34 nmol l⁻¹, 35 nmol l⁻¹, 36 nmol l⁻¹, 37 nmol l⁻¹, 38 nmol l⁻¹, 39 nmol l⁻¹, o 40 nmol l⁻¹. En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 1 nmol l⁻¹. En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 3 nmol l⁻¹. En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 5 nmol l⁻¹. En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 10 nmol l⁻¹. En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 20 nmol l⁻¹. En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 30 nmol l⁻¹. En un aspecto relacionado, la concentración del primer aptámero es de al menos 32 nmol l⁻¹.

En otro aspecto y para cualquiera de las realizaciones que se desvelan en el presente documento, la concentración del segundo aptámero es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 200 nM (o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 o 200 nM). En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 100 nM (o 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nM). En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM (o 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nM).

En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 2,5 nM, 3 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM, 40 nM, 45 nM, 50 nM, 55 nM, 60 nM, 65 nM, 70 nM, 75 nM, 80 nM, 85 nM, 90 nM, 95 nM o 100 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 2 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 2,5 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 5 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 10 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 20 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 30 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 40 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 50 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 60 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 70 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 80 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 90 nM. En un aspecto relacionado, la concentración del segundo aptámero es de al menos 100 nM.

La presente divulgación describe adicionalmente una molécula de ácido nucleico que comprende al menos aproximadamente 15 a al menos aproximadamente 100 nucleótidos (o al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81,

ES 2 707 727 T3

82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos) al menos una pirimidina modificada en el C-5 y es capaz de unirse a una proteína de superficie celular de un microorganismo.

5 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos (o 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos).

10 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 pirimidinas modificadas en el C-5.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o más de pirimidinas modificadas en el C-5.

15 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico es capaz de unirse a la proteína de superficie celular con una constante de unión de equilibrio (K_d) de desde aproximadamente 0,03 nM a aproximadamente 4,7 nM (o 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,3, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35, 0,36, 0,37, 0,38, 0,39, 0,4, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7 nM)

20 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico es capaz de unirse a la proteína de superficie celular con una constante de unión de equilibrio (K_d) de al menos aproximadamente 0,03, 0,07, 0,08, 0,14, 0,15, 0,16, 0,22, 0,35, 0,47, 0,63, 0,73, 0,79, 0,84, 1,3, 1,35, 1,98, 2,17, 3,9 y 4,73 nM.

25 En otro aspecto, la pirimidina modificada en el C-5 se selecciona del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (BndC); 5-(N-2-feniletancarboxiamida)-2'-deoxicidina (PEdC); 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PPdC); 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NapdC); 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NapdC); 5-(N-1-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NEdC); 5-(N-2-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NEdC); 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (BndU); 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (iBudU); 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-deoxiuridina (TrpdU); cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-deoxiuridina y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (NapdU).

En otro aspecto, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, parásito y virus.

35 En otro aspecto, el microorganismo es una célula bacteriana. En un aspecto relacionado, la célula bacteriana es patógena.

En otro aspecto, la célula bacteriana es una célula de estafilococos. En un aspecto relacionado, la célula bacteriana es una célula de *Staphylococcus aureus*.

40

En otro aspecto, la proteína de superficie celular es una proteína de superficie celular bacteriana.

En otro aspecto, la proteína de superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en SPA, ClfA, ClfB, FnbA, FnbB, IsdA, IsdB, IsdC, IsdH y SasD.

45

En otro aspecto, la primera proteína de superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en SPA y ClfA.

50 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de GGCWWCGGGWACCWAWWWNGGWWWAGCC(N)_nGWC (SEQ ID NO: 14), en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto relacionado, n es 2.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico es de al menos aproximadamente 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.

55

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico es de aproximadamente 32 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (o 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de longitud).

60

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de AWCWGGWWC(N)_nAWCWGGWWWWWAAG (SEQ ID NO: 15), en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. En un aspecto relacionado, n es de 5 a 20 (o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20). En otro aspecto, n es de 10 a 18 (o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18). En un aspecto relacionado, n es aproximadamente 16.

65

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico es de al menos aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.

- 5 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico es de aproximadamente 18 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (o 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de longitud).
- 10 En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-8 y 10-12, en donde W es una pirimidina modificada en el C-5.

- 15 En otro aspecto, la pirimidina modificada en el C-5 se selecciona del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (BndC); 5-(N-2-feniletilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PEdC); 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PPdC); 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NapdC); 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NapdC); 5-(N-1-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NEdC); 5-(N-2-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NEdC); 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU); 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU); 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU); cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU).
- 20

La presente divulgación describe adicionalmente un kit para detectar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra que comprende una molécula de ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente.

- 25 Los anteriores y otros objetivos, características, y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La FIG. 1 muestra la captura de bacterias de *Staphylococcus aureus* con aptámeros de SpA inmovilizados sobre perlas paramagnéticas. La eficacia de la captura celular se calculó mediante cultivo cuantitativo de las perlas. En la Figura 1A la concentración de aptámeros se fijó en 20 nmol l⁻¹ para capturar células en una muestra de 0,1 ml. (■) 5000 UFC, (▨) 500 UFC y (▩) 50 UFC. En la Figura 1B la densidad celular se fijó en 6600 UFC en una muestra de 0,1 ml y se variaron las concentraciones de aptámeros de captura. (■) 32 nmol l⁻¹, (▨) 10 nmol l⁻¹, (▩) 3,2 nmol l⁻¹, (▪) 1 nmol l⁻¹, y (▫) 0,32 nmol l⁻¹. La eficacia de la captura se calculó mediante cultivo cuantitativo.
- 35 La FIG. 2 muestra la captura a base de aptámeros de *Staphylococcus aureus*, y amplificación de señal mediante qPCR de aptámeros unidos a componentes de superficie celular altamente abundantes en comparación con qPCR de copias genómicas únicas. Se usaron aptámeros ClfA no amplificables, biotinilados 4522-5 o 4503-73 para la captura de *S. aureus* o *S. epidermidis* (control negativo, seguido por la detección con aptámero SpA 4520-8 amplificable. Se usó una biblioteca de aptámeros al azar como control negativo para la detección. Se llevó a cabo la amplificación de PCR de una diana genómica (gen *sasD*) para la referencia, usando el mismo título celular (10⁸ células ml⁻¹).
- 40 La FIG. 3 muestra un análisis SDS-PAGE de proteínas de *S. aureus* asociadas a superficie celular sobreexpresadas en forma recombinante en *E. coli* y purificadas mediante cromatografía de afinidad sobre agarosa de Ni-NTA y StrepTactin Sepharose.
- 45 La FIG. 4 muestra ensayos de unión por afinidad de radiomarcador con aptámeros individuales de agrupación SELEX 4520 NapdU y 4531 TrpdU usando proteína SpA purificada diluida en serie desde 0,001-100 nmol l⁻¹ (Figura 4A) y células enteras diluidas a 10⁷, 10⁶, 10⁵, y 10⁴ UFC ml⁻¹ (Figura 4B).
- 50 La FIG. 5 muestra la captura de células bacterianas con aptámeros de SpA y ClfA inmovilizados sobre perlas de estreptavidina paramagnéticas. Se controló la eficacia de captura mediante cultivo semicuantitativo a baja densidad celular (Figura 5A) o mediante disminución en la turbidez a elevada densidad celular (Figura 5B).

Descripción detallada

55 I. Términos y métodos

- A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan según su uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes sobre biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).
- 60

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

65

Aptámero: La expresión aptámero, como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero sin limitación, unirse a la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de una forma que modifica o altera la diana o la actividad funcional de la diana, unirse covalentemente a la diana (como en un inhibidor suicida) y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula.

Complejo de afinidad de aptámeros: Como se usa en el presente documento, las expresiones "complejo de afinidad de aptámero-diana", "complejo de afinidad de aptámeros" o "complejo de aptámero" o "complejo" se refieren a un complejo no covalente que se forma mediante la interacción de un aptámero con su molécula diana. "Complejos de afinidad de aptámero-diana", "complejos de afinidad de aptámeros" o "complejos de aptámeros" o "complejos" se refieren a más de uno de tal conjunto de complejos. Un complejo de afinidad de aptámero-diana, un complejo de afinidad de aptámeros o un complejo de aptámeros o complejo pueden en general revertirse o disociarse mediante un cambio en una condición medioambiental, por ejemplo, un aumento en la temperatura, un aumento en la concentración de sal o una adición de un desnaturalizante. Si se desea; sin embargo, tales complejos pueden ser una interacción covalente.

Amplificable: La expresión amplificable, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula (por ejemplo, molécula de ácido nucleico o aptámero) que es capaz de ser duplicada o copiada para hacer más copias de la molécula.

Análogo: La expresión análogo, como se usa en el presente documento, se refiere a un análogo químico estructural así como a un análogo químico funcional. Un análogo químico estructural es un compuesto que tiene una estructura similar a otro compuesto químico pero que difiere por uno o más átomos o grupos funcionales. Esta diferencia puede ser un resultado de la adición de átomos o grupos funcionales, ausencia de átomos o grupos funcionales, el reemplazo de átomos o grupos funcionales o una combinación de los mismos. Un análogo químico funcional es un compuesto que tiene propiedades químicas, bioquímicas y/o farmacológicas similares. La expresión análogo también puede abarcarse estereoisómeros S y R de un compuesto.

Bioactividad: La expresión bioactividad, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más proceso intercelular, intracelular o extracelular (por ejemplo, unión célula-célula, unión ligando-receptor, señalización celular, etc.) que puede influir en procesos fisiológicos o patofisiológicos.

Muestra biológica: Una muestra biológica, como se usa en el presente documento, se refiere a "muestra" y "muestra de ensayo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier material, fluido biológico, tejido o célula obtenido, o de otro modo, derivado de un individuo. Esta incluye sangre (incluida sangre entera, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, capa leucocitaria, plasma y suero), esputo, lágrimas, moco, lavados nasales, aspirados nasales, aire espirado, orina, semen, saliva, fluido meníngeo, fluido amniótico, fluido glandular, fluido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, células, un extracto celular y un fluido cerebroespinal. Esto también incluye fracciones experimentalmente separadas de todos los anteriores. Por ejemplo, puede fraccionarse una muestra de sangre en suero o en fracciones que contienen tipos particulares de células sanguíneas, tales como glóbulos rojos o glóbulos blancos (leucocitos). Si se desea, una muestra puede ser una combinación de muestras de un individuo, tal como una combinación de una muestra de tejido y de fluido. La expresión "muestra biológica" también incluye materiales que contienen material sólido homogeneizado, tal como a partir de una muestra de heces, una muestra tisular o una biopsia tisular, por ejemplo. La expresión "muestra biológica" también incluye materiales derivados de un cultivo tisular o un cultivo celular. Puede emplearse cualquier método adecuado para obtener una muestra biológica; métodos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, flebotomía, hisopado (por ejemplo, hisopado bucal) y un procedimiento de biopsia de aspirado con agua fija. Tejidos a modo de ejemplo susceptibles de aspiración con agua fina incluyen ganglio linfático, pulmón, lavados pulmonares, lavado broncoalveolar (LBA), tiroides, mama e hígado. También se pueden recoger muestras, por ejemplo, mediante microdissección (por ejemplo, microdissección de captura láser (MCL) o microdissección láser (MDL)), lavado de vejiga, frotis (por ejemplo, un frotis de PAP) o lavado ductal. Una "muestra biológica" obtenida o derivada de un individuo incluye cualquier tal muestra que ha sido procesada de cualquier modo adecuado después de haber sido obtenida a partir del individuo.

Pirimidina modificada en el C-5: Pirimidina modificada en el C-5 (o nucleótido modificado en el C-5), como se usa en el presente documento, se refiere a una pirimidina con una modificación en la posición C-5. Ejemplos de pirimidina modificada en el C-5 incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos con números 5.719.273 y 5.945.527, así como, La solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/422.957, presentada el 14 de diciembre de 2010, titulada "*Nuclease Resistant Oligonucleotides*". Se proporcionan ejemplos adicionales en el presente documento.

Proteína de superficie celular: Proteína de superficie celular, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que se expresa sobre la superficie de una célula, membrana celular, pared celular o tiene un dominio que está expuesto sobre la superficie externa de la célula, sobre la membrana celular externa o la envoltura de la pared celular con otra parte o dominio de la proteína expresada dentro de la membrana celular o la envoltura de la pared celular y/o en el espacio intracelular de una célula.

Secuencia de consenso: Secuencia de consenso, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos que representa el nucleótido más frecuentemente observado encontrado en cada posición de una serie de secuencias de ácido nucleico sujetas a una alineación de secuencias.

Enlace covalente: Enlace o interacción covalente se refiere a un enlace químico que implica la compartición de al menos un par de electrones entre átomos.

Enriquecer: El término enriquecer (o enriquecimiento), como se usa en el presente documento, significa someter una muestra a un proceso de modo que la representación proporciona de al menos un componente (por ejemplo,

el complejo o los complejos aptámero-diana) o grupo de componentes se ve de forma resultante potenciado en comparación con otro componente o grupo de componentes. Enriquecer puede significar enriquecer un componente por al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % en comparación con otro componente.

5 **Inhibir:** El término inhibir, como se usa en el presente documento, se refiere a prevenir o reducir la expresión de un péptido o un polipéptido hasta un grado en el que el péptido o polipéptido ya no tiene más una actividad o bioactividad medible; o reducir la estabilidad y/o reducir o prevenir la actividad de un péptido o polipéptido hasta un grado en el que péptido o polipéptido ya no tiene más una actividad o bioactividad medible.

10 **Microorganismo:** La expresión microorganismo, como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo de célula única o multicelular y puede incluir bacterias, arqueas, protozoos, hongos, algas, plantas microscópicas, rotíferos, virus en planarias.

Modificado: La expresión "modificado" (o modificar o modificación) y cualquier variación de los mismos, cuando se usan en referencia a un oligonucleótido, significan que al menos una de las cuatro bases nucleotídicas constituyentes (es decir, A, G, T/U y C) del oligonucleótido es un análogo o éster de un nucleótido de origen natural.

15 **Modular:** La expresión modular, como se usa en el presente documento, significa alterar la expresión del nivel de un péptido, proteína o polipéptido aumentando o disminuyendo su nivel de expresión con respecto a un nivel de expresión de referencia, y/o alterar la estabilidad y/o actividad de un péptido, proteína o polipéptido aumentando o disminuyendo su nivel de estabilidad y/o actividad con respecto a un nivel de estabilidad y/o actividad de referencia.

20 **Enlace no covalente:** Enlace no covalente o interacción no covalente se refiere a un enlace o interacción químico que no implica la compartición de pares de electrones entre átomos. Ejemplos de enlaces o interacciones no covalentes incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos (enlaces electrostáticos), fuerzas de van der Waals e interacciones hidrófobas.

25 **Ácido nucleico:** Ácido nucleico, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier secuencia de ácidos nucleicos que contiene ADN, ARN y/o análogos de los mismos y puede incluir formas unicatenarias, bicatenarias y multcatenarias. Los términos "ácido nucleico", "oligo", "oligonucleótido" y "polinucleótido" pueden usarse indistintamente.

30 **Farmacéuticamente aceptable:** Farmacéuticamente aceptable, como se usa en el presente documento, significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y, más particularmente, en los seres humanos.

35 **Sal farmacéuticamente aceptable:** Sal farmacéuticamente aceptable o sal de un compuesto (por ejemplo, aptámero), como se usa en el presente documento, se refiere a un producto que contiene un enlace iónico y está normalmente producido mediante la reacción del compuesto bien con un ácido o una base, adecuado para su administración a un individuo. Una sal farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitación, sales de adición de ácidos que incluyen clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, hidrogenosulfatos, alquilsulfonatos, arilsulfonatos, arilalquilsulfonatos, acetatos, benzoatos, citratos, maleatos, fumaratos, succinatos, lactatos, y tartratos; cationes alcali metálicos tales como Li, Na, K, sales de metales alcalinotérreos tales como Mg o Ca, o sales de aminas orgánicas.

40 **Composición farmacéutica:** Composición farmacéutica, como se usa en el presente documento, se refiere a una formulación que comprende un aptámero en una forma adecuada para su administración a un individuo. Una composición farmacéutica se formula normalmente para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen, pero sin limitación, administración oral y parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, por inhalación, tópica, transdérmica, transmucosa y rectal.

45 **SELEX:** La expresión SELEX, como se usa en el presente documento, se refiere en general a la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una molécula diana de un modo deseable, por ejemplo, uniéndose con alta afinidad a una proteína; y la amplificación de esos ácidos nucleicos seleccionados. SELEX se puede utilizar para identificar aptámeros con alta afinidad por una molécula diana específica. El término SELEX y "proceso SELEX" pueden usarse indistintamente.

50 **Identidad de secuencia:** Identidad de secuencia, como se usa en el presente documento, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos es una función del número de posiciones de nucleótidos idénticos compartidos por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que necesita ser introducido para optimizar la alineación de dos o más secuencias. Se puede realizar la comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos o más secuencias usando un algoritmo matemático, tal como programas BLAST y Gapped BLAST en sus parámetros por defecto (por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990; véase también BLASTN en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Para comparaciones de secuencia, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, si fuera necesario, se designan los coordenados de subsecuencia y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la una o más secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el

Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase, en general, Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987). Como se usa en el presente documento, cuando se describe el porcentaje de identidad de un ácido nucleico, tal como un aptámero Spa (o SPA), la secuencia de la cual es al menos, por ejemplo, aproximadamente el 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, está previsto que la secuencia de ácidos nucleicos sea idéntica a la secuencia de referencia salvo por que la secuencia de ácidos nucleicos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de ácidos nucleicos deseada, la secuencia de la cual es al menos aproximadamente el 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de referencia, puede eliminarse o sustituirse hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia por otro nucleótido o puede insertarse dentro de la secuencia de referencia algún número de nucleótidos de hasta el 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia (denominada en el presente documento como una inserción). Estas mutaciones de la secuencia de referencia para generar la secuencia deseada pueden producirse en las posiciones 5' y 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Soporte sólido: Soporte sólido se refiere a cualquier sustrato que tiene una superficie a la cual se pueden unir moléculas, directa o indirectamente, a través de o bien enlaces covalentes o no covalentes. El soporte sólido puede incluir cualquier material de sustrato que sea capaz de proporcionar soporte físico para la captura de elementos o sondas que están unidos a la superficie. El material es generalmente capaz de soportar condiciones relacionadas con la unión de los elementos o sondas de captura con respecto a la superficie y cualquier tratamiento posterior, manipulación o procesamiento que se produzca durante la realización del ensayo. Los materiales pueden ser de origen natural, sintéticos o una modificación de un material de origen natural. Materiales de soporte sólido adecuados pueden incluir silicio, un chip oblea de silicio, grafito, superficies de espejo, laminaciones, membranas, cerámicas, plásticos (incluidos polímeros tales como, por ejemplo, poli(cloruro de vinilo), copolímeros de cicloolefina, geles o perlas de agarosa, poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon®), nailon, poli(butirato de vinilo), germanio, arseniuro de galio, oro, plata, películas de Langmuir Blodgett, un chip pasante de flujo, etc., ya sea usados por sí mismos o junto con otros materiales. Pueden considerarse materiales rígidos adicionales, tales como vidrio, que incluye sílice y además incluye, por ejemplo, vidrio que está disponible como Biovidrio. Otros materiales que pueden emplearse incluyen materiales porosos, tal como, por ejemplo, perlas de vidrio poroso controladas, resinas de agarosa o Sepharose® con perlas reticuladas o copolímeros de bis-acrilamina y azalactona reticulada. Otras perlas incluyen nanopartículas, perlas de polímero, perlas de núcleo sólido, perlas paramagnéticas o microperlas. Cualquier otro material conocido en la técnica que sea capaz de tener uno o más grupos funcionales, tales como cualquiera de un amino, carboxilo, tiol o grupo funcional de hidroxilo, por ejemplo, incorporado sobre su superficie, también se contemplan.

El material usado para un soporte sólido puede tener cualquiera de varias configuraciones que varían desde simple a compleja. El soporte sólido puede tener cualquiera una de varias de formas, incluidas una tira, una placa, disco, varilla, partículas, perlas, tubo, pocillo (microtítulo) y similares. El soporte sólido puede ser poroso o no poroso, magnético, paramagnético o no magnético, polidisperso o monodisperso, hidrófilo o hidrófobo. El soporte sólido también puede estar en la forma de un gel o una suspensión de partículas firmemente compactas (como en una matriz de columna) o ligeramente compactas.

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

Un objetivo de la presente invención es convertir una señal de proteína en una señal de aptámero. Como resultado de la cantidad de aptámeros recogidos/detectados es indicativo de, y puede ser directamente proporcional a, la cantidad de moléculas diana unidas y a la cantidad de moléculas diana en la muestra. Puede emplearse un número de esquemas de detección sin eluir el complejo de afinidad de aptámero-diana o complejo covalente de aptámero-diana a partir del segundo soporte sólido después del particionamiento o captura. Además de las siguientes realizaciones de métodos de detección, los expertos en la técnica conocerán otros métodos de detección.

Muchos métodos de detección requieren que se incorpore una etiqueta explícita en el aptámero antes de su detección. En estas realizaciones, etiquetas, tal como, por ejemplo, pueden incorporarse tintes fluorescentes o quimioluminiscentes en los aptámeros o bien durante o bien después de la síntesis usando técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos. Pueden incorporarse etiquetas radioactivas o bien durante la síntesis o bien después de la síntesis usando reacciones enzimáticas estándar con los reactivos adecuados. El etiquetado también se puede

producir después de la segunda partición y elución usando técnicas enzimáticas adecuadas. Por ejemplo, usando un cebador con las etiquetas anteriormente mencionadas, PCR incorporará etiquetas en el producto de amplificación de los aptámeros eluidos. Cuando se usa una técnica de gel para la cuantificación, pueden incorporarse distintos tamaños de etiquetas de masa usando PCR también. Estas etiquetas de masa también pueden incorporar distintos tintes fluorescentes o quimioluminiscentes para una capacidad de multiplexación adicional. Las etiquetas pueden añadirse indirectamente a aptámeros usando una etiqueta específica incorporada en el aptámero, o bien durante la síntesis o bien después sintéticamente y, a continuación, añadieron una sonda que se asocia con el marcado y porta la etiqueta. Las etiquetas incluyen las descritas anteriormente así como enzimas usadas en ensayos estándar para lectura colorimétrica, por ejemplo. Estas enzimas trabajan en combinación con sustratos enzimáticos e incluyen enzimas tales como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). Las etiquetas también incluyen materiales o compuestos que son grupos funcionales electroquímicos para la detección electroquímica.

Por ejemplo, el aptámero puede etiquetarse, tal como se han descrito anteriormente, con un isótopo radioactivo tal como ^{32}P antes de entrar en contacto con la muestra en ensayo. Empleando cualquiera una de los cuatro ensayos básicos y variaciones de los mismos tal como se ha descrito anteriormente, la detección de aptámeros pueden conseguirse simplemente mediante cuantificación de la radioactividad sobre el segundo soporte sólido al final del ensayo. Los recuentos de radioactividad serán directamente proporcionales a la cantidad de diana en la muestra de ensayo. De manera similar, etiquetar un aptámero con un tinte fluorescente, tal como se han descrito anteriormente, antes de entrar en contacto con la muestra en ensayo permite una lectura fluorescente simple directamente sobre el segundo soporte sólido. Una etiqueta quimioluminiscente o un punto cuántico puede emplearse similarmente para la lectura directa desde el segundo soporte sólido, sin requerir elución de aptámeros.

En otra realización, la cantidad o concentración del complejo de afinidad de aptámero-diana (o complejo covalente de aptámero-diana) se determina usando una "baliza molecular" durante un proceso replicativo (véase, por ejemplo, Tyagi et al., Nat. Biotech. J. 6:49 53, 1998; Patente de EE.UU n.º 5.925.517). Una baliza molecular es una sonda de ácido nucleico específica que se pliega en un bucle horquillado y contiene un fósforo sobre un extremo y un interruptor sobre el otro extremo de la estructura horquillada de modo que no se genera señal o muy poca por el fósforo cuando se forma la horquilla. La secuencia de bucle es específica para una secuencia de polinucleótidos diana y, cuando se hibrida a la secuencia de aptámeros la horquilla se despliega y, de este modo, genera una señal fluorescente.

Para la detección multiplexada de un número pequeño de aptámeros aún unidos al segundo soporte sólido, pueden emplearse tintes fluorescentes con distintos espectros de excitación/emisión para detectar y cuantificar dos o tres, o cinco o hasta diez aptámeros individuales. De igual modo, pueden emplearse puntos cuánticos de distintos tamaños para lecturas multiplexadas. Los puntos cuánticos pueden introducirse después de particionar aptámero libre a partir del segundo soporte sólido. Mediante el uso de secuencias de hibridación específicas de aptámeros unidas a puntos cuánticos únicos pueden realizarse lecturas multiplexadas para 2, 3, 4, 5 y hasta 10 aptámeros. El etiquetado de distintos aptámeros con distintos isótopos radioactivos que pueden detectarse individualmente, tales como ^{32}P , ^3H , ^{13}C , y ^{35}S , también pueden usarse para lecturas multiplexadas.

En una realización, se usa una matriz de hibridación de ADN estándar, o chip, para hibridar cada aptámero o fotoaptámeros a una única o serie de sondas únicas inmovilizadas sobre un portaobjetos o chip tal como disposiciones de Agilent, matrices de Illumina BeadChip, matrices de NimbleGen o matrices impresas personalizadas. Cada sonda única es complementaria a una secuencia sobre el aptámero. La secuencia complementaria puede ser un marcador de hibridación único incorporado en el aptámero o una porción de la secuencia de aptámeros o la secuencia de aptámeros completa. Los aptámeros liberados desde el soporte sólido después de la segunda partición o captura se añaden a un tampón de hibridación adecuado y se procesan usando métodos de hibridación estándar. Por ejemplo, la solución de aptámeros se incuba durante 12 horas con una matriz de hibridación de ADN a aproximadamente 60 °C para asegurar la rigurosidad de la hibridación. Las matrices se lavan y a continuación se escanean en un escáner de portaobjetos fluorescente, produciendo una imagen de la intensidad de hibridación de aptámeros sobre cada característica de la matriz. La segmentación y cuantificación de imágenes se consigue usando un software de procesamiento de imágenes, tal como ArrayVision. En una realización, pueden detectarse ensayos de aptámeros multiplexados usando hasta 25 aptámeros, hasta 50 aptámeros, hasta 100 aptámeros, hasta 200 aptámeros, hasta 500 aptámeros, hasta 1.000 aptámeros y hasta 10.000 aptámeros.

En una realización, se usan microperlas direccionables que tienen múltiples sondas de ADN complementarias a los aptámeros tal como se han descrito anteriormente para la hibridación. Las microperlas pueden ser direccionable con tintes fluorescentes únicos, tales como tecnología de perlas de Luminex o usar etiquetas de códigos de barras como en la tecnología de Illumina VeraCode o transpondedores encendidos por láser. En una realización, los aptámeros liberados desde el segundo soporte sólido se añaden a un tampón de hibridación adecuado y se procesan usando métodos de hibridación estándar de microperlas. Por ejemplo, la solución de aptámeros se incuba durante dos horas con un conjunto de microperlas a aproximadamente 60 °C para asegurar la rigurosidad de la hibridación. Las soluciones se procesan a continuación sobre un instrumento de Luminex que cuenta los tipos de perlas individuales y cuantifica la señal fluorescente de aptámero. En otra realización, las perlas de VeraCode se ponen en contacto con la solución de aptámeros y se hibridan durante dos horas a aproximadamente 60 °C y, a continuación, se depositan sobre una superficie en rejilla y se escanean un escáner de portaobjetos para su identificación y cuantificación de fluorescencia. En otra realización, las microperlas de transpondedores se incuban con la muestra de aptámero a

aproximadamente 60 °C y a continuación se cuantifican usando un dispositivo apropiado para las microperlas de transpondedores. En una realización, pueden detectarse ensayos de aptámeros multiplexados mediante hibridación a microperlas usando hasta 25 aptámeros, hasta 50 aptámeros, hasta 100 aptámeros, hasta 200 aptámeros y hasta 500 aptámeros.

5 La muestra que contiene los aptámeros eluidos puede procesarse para incorporar marcadores de masa únicos junto con etiquetas fluorescentes tal como se ha descrito anteriormente. Los aptámeros de etiqueta de masa se inyectan a continuación en un instrumento CGE, esencialmente un secuenciador de ADN y los aptámeros se identifican mediante sus masas únicas y se cuantifican usando fluorescencia a partir del tinte incorporado durante la reacción de etiquetado.
10 Un ejemplo ilustrativo de esta técnica ha sido desarrollado por Althea Technologies.

En muchos de los métodos descritos anteriormente, la solución de aptámeros puede amplificarse y opcionalmente marcarse antes de la cuantificación. Puede usarse amplificación de PCR estándar con la solución de aptámeros eluida a partir del segundo soporte sólido. Tal amplificación puede usarse antes de la hibridación de matriz de ADN, hibridación de microperlas y lectura de CGE.
15

En otra realización, el complejo de afinidad de aptámero-diana (o complejo covalente de aptámero-diana) se detecta y/o cuantifica usando Q-PCR. Como se usa en el presente documento, "Q-PCR" se refiere a una reacción de PCR realizada de tal modo y en tales condiciones controladas que los resultados del ensayo son cuantitativos, es decir, el ensayo es capaz de cuantificar la cantidad o concentración de aptámero presente en la muestra de ensayo.
20

En una realización, la cantidad o concentración del complejo de afinidad de aptámero-diana (o complejo covalente de aptámero-diana) en la muestra de ensayo se determina usando PCR de aqMan®. Esta técnica se basa generalmente sobre la actividad de exonucleasa en 5'-3' de la enzima que reemplaza oligonucleótido para generar una señal a partir de una secuencia dirigida. Se selecciona una sonda TaqMan basándose en la secuencia del aptámero a cuantificar e incluye generalmente un extremo 5' de fósforo, tal como 6-carboxifluoresceína, por ejemplo, un interruptor de extremo 3', tal como, por ejemplo, una 6-carboxitetrametilfluoresceína, para generar señal según la secuencia de aptámeros se amplifica usando reacción en cadena de polimerasa (PCR). Según la polimerasa copia la secuencia de aptámeros, la actividad de exonucleasa libera el fósforo de la sonda, que está hibridado corriente abajo de los cebadores de PCR, generando, de esta forma, una señal. La señal aumenta según se produce el producto replicativo. La cantidad de producto de PCR depende tanto el número de ciclos replicativos realizados así como la concentración de partida del aptámero.
25
30

En otra realización, la cantidad o concentración de un complejo de afinidad de aptámero-diana (o complejo covalente de aptámero-diana) se determina usando un tinte fluorescente de intercalación durante el proceso replicativo. El tinte de intercalación, tal como, por ejemplo, SYBR® Green, genera una gran señal fluorescente en la presencia de ADN bicatenario en comparación con la señal fluorescente generada en la presencia de ADN unicatenario. Según se forma el producto de ADN bicatenario durante la PCR, la señal producida por el tinte aumenta. La magnitud de la señal producida depende de tanto el número de ciclos de PCR como la concentración de partida del aptámero.
35
40

En otra realización, el complejo de afinidad de aptámero-diana (o complejo covalente de aptámero-diana) se detecta y/o cuantifica usando espectrometría de masas. Pueden introducirse marcadores de masa única usando técnicas enzimáticas descritas anteriormente. Para la lectura de espectroscopía de masas, no se requiere ninguna etiqueta de detección, en su lugar la masa misma se usa para tanto identificar como, usando técnicas comúnmente usadas por los expertos en la técnica, cuantificar basándose en el emplazamiento y área por debajo de los máximos de masa generados durante el análisis de espectroscopía de masas. Un ejemplo que usa espectroscopía de masas es el sistema de MassARRAY® desarrollado por Sequenom.
45

SOMAmer: El término SOMAmer (o reactivo de SOMAmer), como se usa en el presente documento, se refiere a un aptámero que tiene características de tasas de disociación mejoradas. Los reactivos de SOMAmer se denominan, de forma alternativa, como aptámeros modificados de tasa de disociación lenta y pueden seleccionarse mediante métodos de SELEX mejorados descritos en la publicación de los EE.UU. n.º 20090004667, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates". Aptámero modificado de tasa de disociación lenta se refiere a un aptámero (incluidos aptámeros que comprenden al menos un nucleótido con una modificación hidrófoba) con una tasa de disociación ($t_{1/2}$) de ≥ 30 minutos, ≥ 60 minutos, ≥ 90 minutos, ≥ 120 minutos, ≥ 150 minutos, ≥ 180 minutos, ≥ 210 minutos, o ≥ 240 minutos.
50
55

- Secuencia de separación:** Secuencia de separación, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier secuencia comprendida de pequeña(s) molécula(s) unida(s) covalentemente en el extremo 5', extremo 3' o en ambos extremos 5' y 3' de la secuencia de ácidos nucleicos de un aptámero. Secuencias de separación a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, polietilenglicoles, cadenas de hidrocarburos y otros polímero o copolímeros que proporcionan un armazón covalente que conecta las regiones de consenso mientras que preserva la actividad de unión diana-aptámero. En determinados aspectos, la secuencia de separación puede unirse covalentemente al aptámero mediante enlaces estándares tales como el terminal 3' o 5' de hidroxilo, 2' de carbono o modificación de base tal como la posición C5 de pirimidinas o posición C8 de purinas.
- Retirar sustancialmente:** Retirar sustancialmente, como se usa en el presente documento, significa retirar al menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o más de un componente o componentes (por ejemplo, material no unido al soporte sólido) en comparación con otro componente (por ejemplo, material unido al soporte sólido o complejo de aptámero-diana).
- Marcador:** Tal como se divulga en el presente documento, un aptámero puede comprender además un "marcador", que se refiere a un componente que proporciona un medio para unir o inmovilizar un aptámero (y cualquier molécula diana que esté unida a este) a un soporte sólido y/o un medio para detectar el aptámero o el complejo (complejo aptámero-diana). Un "marcador" es un resto que es capaz de asociarse con un "elemento de captura". "Marcadores" o "elementos de captura" se refiere a más de un tal conjunto de componentes. El marcador puede unirse o incluirse en el aptámero mediante cualquier método adecuado. En general, el marcador permite al aptámero a asociarse, tanto directa como indirectamente, con un elemento de captura o receptor que está unido al soporte sólido. El elemento de captura se escoge normalmente (o designa) para que sea altamente específico en su interacción con el marcador y para retener esa asociación durante etapas de procesamiento o procedimientos posteriores. Un marcador puede permitir la localización de un complejo de afinidad de aptámero-diana (o complejo de afinidad de aptámero-diana) a una dirección espacialmente definida sobre un soporte sólido. Distintos marcadores, por lo tanto, pueden permitir la localización de distintos complejos de afinidad de aptámero-diana a distintas direcciones espacialmente definidas sobre un soporte sólido. Un marcador puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un afflicuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, un ligando, un lípido, biotina, polihistidina o cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores o cualquier otra estructura con la que un elemento de captura (o molécula de enlace, tal como se describe a continuación) pueda designarse o configurarse para unirse o, de otro modo, asociarse con especificidad. En el contexto de un marcador para fines de detección, el marcador puede ser un tinte, un punto cuántico, un radiomarcador, sitios de cebador de PCR, un grupo funcional electroquímico y una enzima más un sustrato de enzima detectable. Un marcador puede comprender dos dominios o regiones distintas que se unen al aptámero para permitir que se detecte el aptámero (por ejemplo, sitios de cebador de PCR incluirían dos secuencias de ácido nucleico distintas que pueden unirse en el extremo 5' o 3' del aptámero o en algunos casos donde el sitio de cebador de PCR se une al extremo 5' del aptámero y el segundo conjunto de cebador de PCR (del par) se une al extremo 3' del aptámero.
- En general, el marcador puede añadirse al aptámero o bien antes o bien después del SELEX. En una realización, el marcador se incluye en el extremo 5' del aptámero. En otra realización, el marcador se incluye en el extremo 3' del aptámero. En otra realización más, pueden incluirse marcadores tanto en los extremos 3' y 5' de los aptámeros. En otra realización, el marcador puede ser un segmento interno del aptámero.
- Molécula diana:** Molécula diana (o diana), como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto o molécula sobre la cual un ácido nucleico puede actuar se un modo deseable (por ejemplo, uniéndose a la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de una forma que modifica o altera la diana o la actividad funcional de la diana, unirse covalentemente a la diana (como en un inhibidor suicida) y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula). Los ejemplos no limitantes una molécula diana incluyen una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido, polisacárido, glucoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier porción o fragmento de cualquiera de los anteriores, etc. Prácticamente cualquier efector químico o biológico puede ser una diana adecuada. Pueden servir como dianas moléculas de cualquier tamaño. También se puede modificar una diana de ciertas maneras para mejorar la probabilidad o resistencia de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana también puede incluir cualquier variación menor de una molécula o compuesto particular, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones en su secuencia de aminoácidos, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado, que no altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. "Moléculas diana" o "dianas" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas.

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

- Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de nucleótidos e incluyen ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y modificaciones de estos tipos de ácidos nucleicos, oligonucleótidos y polinucleótidos, en donde se incluye la unión de varias entidades o restos a las unidades nucleotídicas en cualquier posición. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", y "ácido nucleico" incluyen moléculas de cadena simple o doble así como moléculas de triple hélice. Ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido son términos más amplios que el término aptámero y, por tanto, los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido incluyen polímeros de nucleótidos que son aptámeros, pero los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido no se limitan a aptámeros.
- Como se usa en el presente documento, los términos "modificar", "modificado", "modificación" y cualquier variación de los mismos, cuando se usan en referencia a un oligonucleótido, significan que al menos una de las cuatro bases nucleotídicas constituyentes (es decir, A, G, T/U y C) del oligonucleótido es un análogo o éster de un nucleótido de origen natural. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado confiere resistencia a nucleasa al oligonucleótido. En algunas realizaciones, los nucleótidos modificados llevan a interacciones predominantemente hidrófobas de aptámeros con dianas de proteína dando como resultado una elevada eficacia de unión y complejos de co-cristal estables. Una pirimidina con una sustitución en la posición C-5 es un ejemplo de un nucleótido modificado. Modificaciones pueden incluir modificaciones de cadena principal, metilaciones, combinaciones de emparejamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como la protección. Otras modificaciones pueden incluir sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y aquellas con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquilantes y aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos, alfa anoméricos, etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en el azúcar de un nucleótido puede reemplazarse por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse mediante grupos de protección estándar; o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH terminales 5' y 3' se pueden fosforilar o sustituir con aminas, restos de grupos de protección orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímeros de polietilenglicol (PEG) en algunas realizaciones que varían de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 kDa, polímeros de PEG en algunas realizaciones que varían de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 kDa u otros polímeros sintéticos o biológicos hidrófobos o hidrófilos. En algunas realizaciones, las modificaciones son de la posición C-5 de pirimidinas. Estas modificaciones pueden producirse mediante un enlace de amida directamente en la posición C-5 o mediante otros tipos de enlaces.
- Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son normalmente conocidos en la técnica, incluyendo 2'-O-metilo-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos, tales arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como ribósido de metilo. Como se ha señalado anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en donde el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en donde cada R o R' son independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, al igual que las estructuras de cadena principal alternativas como una cadena principal de poliamida, por ejemplo.
- Como se usa en el presente documento, el término "nucleasa" se refiere a una enzima capaz de escindir el enlace fosfodiéster entre subunidades nucleotídicas de un oligonucleótido. Como se usa en el presente documento, el término "endonucleasa" se refiere a una enzima que escinde enlace(s) de fosfodiéster en un sitio interno al oligonucleótido. Como se usa en el presente documento, el término "exonucleasa" se refiere a una enzima que escinde enlace(s) de fosfodiéster que unen los nucleótidos de extremo de un oligonucleótido. Los fluidos biológicos contienen normalmente una mezcla de tanto endonucleasas como exonucleasas.
- Como se usa en el presente documento, los términos "resistente a nucleasa" y "resistencia a nucleasa" se refiere a la capacidad reducida de un oligonucleótido en servir como un sustrato para una endo- o exonucleasa, de modo que, cuando entra en contacto con una enzima, el oligonucleótido o bien no se desgrada o bien se degrada más lentamente que un oligonucleótido compuesto de nucleótidos modificados.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos una pirimidina", cuando se hace referencia a modificaciones de un ácido nucleico, se refiere a una, varias o todas las pirimidinas en el ácido nucleico, indicando que cualquiera o todas las apariciones de C, T o U en un ácido nucleico pueden ser modificadas o no.
- Como se usa en el presente documento, A, C, G, U y T denotan dA, dC, dG, dU y dT respectivamente, a menos que se especifique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, "ligando de ácido nucleico", "aptámero", y "clon" se utilizan indistintamente para referirse a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero sin limitación, unirse a la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de una forma que modifica o altera la diana o la actividad funcional de la diana, unirse covalentemente a la diana (como en un inhibidor suicida) y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En algunas realizaciones, la acción es afinidad de unión específica por una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido que se une al ligando de ácido nucleico a través de un mecanismo que es independiente de la formación de triple hélice o emparejamiento de bases de Watson/Crick, en donde el aptámero no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de unirse a la molécula diana. Los aptámeros para una diana dada incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos, donde el aptámero es un ligando de la diana, mediante un método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se pueden separar del resto de la mezcla candidata; (b) separar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada de los restos de la mezcla candidata; y (c) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, con lo que se identifican los aptámeros de la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son una cuestión de grado; sin embargo, en este contexto, la "afinidad de unión específica" de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana normalmente con un grado mucho más alto de afinidad que si se une a otros componentes, no diana, en una mezcla o muestra. Un "aptámero" o "ligando de ácido nucleico" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. "Aptámeros" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser de cadena simple, de cadena doble o contener regiones de cadena doble o cadena triple.

Como se usa en el presente documento, "proteína" se utiliza como sinónimo de "péptido", "polipéptido," o "fragmento peptídico". Un polipéptido, proteína, péptido o fragmento peptídico "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula, tejido, fuente libre de células a partir de la cual se ha obtenido la secuencia de aminoácidos, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente.

Un "aptámero SPA" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína SPA. El término "SpA", "SPA" o "Spa" puede usarse indistintamente para referirse a la proteína SPA o aptámero SPA.

Un "aptámero ClfA" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína ClfA.

Un "aptámero ClfB" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína ClfB.

Un "aptámero FnbA" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína FnbA.

Un "aptámero FnbB" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína FnbB.

Un "aptámero LsdA" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína LsdA.

Un "aptámero LsdB" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína LsdB.

Un "aptámero LsdC" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína LsdC.

Un "aptámero LsdH" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína LsdH.

Un "aptámero SasD" es un aptámero que es capaz de unirse a la proteína SasD.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. Los términos en singular "un", "uno", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. "Que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción.

Además, los intervalos en el presente documento se entienden que son una abreviatura de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, un intervalo de 1 a 50 se entiende que incluye cualquier número, combinación de número o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 (así como fracciones de los mismos a menos que el contexto indique claramente lo contrario). Cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de número entero se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como

una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique otra cosa. También, cualquier intervalo numérico citado en el presente documento que se refiere a cualquier característica física, tal como subunidades de polímeros, tamaño o espesores, se entiende que incluyen cualquier número entero dentro del intervalo recitado, a menos que se indique otra cosa. Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" o "que consiste esencialmente de mediana \pm 20 % del intervalo, valor o estructura indicada, a menos que se indique otra cosa. Como se usa en el presente documento, los términos "incluir" y "comprender" son abiertos y se usan de forma sinónima. Debe entenderse que los términos "un", "una" y "uno" tal como se usan en el presente documento se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse que significa o bien uno, ambos o cualquier combinación de los mismos de las alternativas

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente descripción, se describen a continuación los métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, que incluye las explicaciones de términos, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Visión general

La unión de agentes a componentes específicos sobre la superficie de microorganismos pueden ser valiosas herramientas de diagnóstico útiles para distintas plataformas de detección.

SELEX

Normalmente, SELEX incluye preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, unir la mezcla candidata a la molécula diana deseada para formar un complejo de afinidad, separar los complejos de afinidad de los ácidos nucleicos candidatos no unidos, separar y aislar el ácido nucleico del complejo de afinidad, purificar el ácido nucleico e identificar una secuencia de aptámero específica. El proceso puede incluir múltiples ciclos para perfeccionar adicionalmente la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir fases de amplificación en uno o más puntos en el proceso. Véase, por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.475.096, titulada "Nucleic Acid Ligands". El proceso SELEX se puede utilizar para generar un aptámero que se une covalentemente a su diana así como un aptámero que se une no covalentemente a su diana. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.705.337 titulada "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX."

El proceso SELEX se puede utilizar para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas en el aptámero, tal como, por ejemplo, características de administración mejoradas o estabilidad *in vivo* mejorada. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de base y/o ribosa y/o fosfato. Se describen aptámeros identificados con el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados en la patente de Estados Unidos n.º 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. patente estadounidense n.º 5.580.737, véase más arriba, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090098549, titulada "SELEX and PHOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades químicas y físicas expandidas y su uso en SELEX y photoSELEX.

También puede utilizarse SELEX para identificar aptámeros que tienen características de tasa de disociación deseables. Véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20090004667, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates," que describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que pueden unirse a moléculas diana. Como se ha mencionado anteriormente, estos aptámeros de tasa de disociación lenta se conocen como "SOMAmer". Se describen métodos para producir aptámeros o reactivos de SOMAmer y fotoaptámeros o reactivos de SOMAmer que tienen tasas más lentas de disociación de sus respectivas moléculas diana. Los métodos implican poner en contacto la mezcla candidata con la molécula diana, permitir que ocurra la formación de complejos ácido nucleico-diana y realizar un proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta en donde los complejos ácido nucleico-diana con tasas de disociación rápidas se disociarán y no se reformarán, mientras que los complejos con tasa de disociación lenta permanecerán intactos. Además, los métodos incluyen el uso de nucleótidos modificados en la producción de mezclas de ácidos nucleicos candidatos para generar aptámeros o reactivos de SOMAmer con rendimiento de tasa de disociación mejorada.

Una variación de este ensayo emplea aptámeros que incluyen grupo funcionales fotoreactivos que permiten que los aptámeros se unan covalentemente o "fotoreticulen" sus moléculas diana. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.544.776 titulada "Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip." Estos aptámeros fotoreactivos también se denominan como fotoaptámeros. Véase, por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.763.177, patente de Estados Unidos n.º 6.001.577 y patente de Estados Unidos n.º 6.291.184, cada una de las cuales se titula "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"; véase también, por ejemplo, patente estadounidense n.º 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands." Después de poner la micromatriz en contacto con la muestra y de que los fotoaptámeros hayan tenido la oportunidad de unirse a sus moléculas diana, los fotoaptámeros se fotoactivan y el soporte sólido se lava para retirar cualquier

molécula no específicamente unida. Pueden usarse condiciones de lavado duro, puesto que las moléculas diana que están unidas a los fotoaptámeros no se retiran generalmente, debido a los enlaces covalentes creados por el/los grupo(s) funcional(es) fotoactivado(s) sobre los fotoaptámeros.

- 5 En ambos de estos formatos de ensayo, los aptámeros o reactivos de SOMAmer se inmovilizan sobre el soporte sólido a poner en contacto con la muestra. En determinadas circunstancias, sin embargo, la inmovilización de los aptámeros o reactivos de SOMAmer antes de poner en contacto con la muestra pueden no proporcionar un ensayo óptimo. Por ejemplo, la pre-inmovilización de los aptámeros o reactivos de SOMAmer puede dar como resultado una mezcla ineficaz de los aptámeros o reactivos de SOMAmer con las moléculas diana sobre la superficie del soporte sólido, conduciendo, puede ser, a tiempo de reacción largos y, por lo tanto, períodos de incubación extendidos para permitir una unión eficaz de los aptámeros o reactivos de SOMAmer a sus moléculas diana. Además, cuando se emplean fotoaptámeros o fotoaptámeros en el ensayo y dependiendo del material utilizado como soporte sólido, el soporte sólido puede tender a dispersar o absorber la luz usada para efectuar la formación de enlaces covalentes entre los fotoaptámeros o fotoaptámeros y sus moléculas diana. Además, dependiendo del método empleado, la detección de molécula diana unidas a sus aptámeros o fotoaptámeros puede estar sometida a la imprecisión, puesto que la superficie del soporte sólido puede exponerse también y estar afectada por cualquier agente de etiquetado que se use. Finalmente, la inmovilización de los aptámeros o reactivos de SOMAmer sobre el soporte sólido implica generalmente una etapa de preparación de aptámero o reactivo de SOMAmer (es decir, la inmovilización) antes de la exposición de los aptámeros o reactivos de SOMAmer a la muestra y esta etapa de preparación puede afectar la actividad o funcionalidad de los aptámeros o reactivos de SOMAmer.

Se han descrito ensayos de aptámeros que permiten a un aptámero capturar su diana en solución y a continuación emplear etapas de separación que están designadas para retirar componentes específicos de la mezcla de aptámero-diana antes de su detección (véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20090042206, titulada "Multiplexed Analyses of Test Samples").

Los métodos de ensayo de aptámeros descritos permiten la detección y cuantificación de una diana de ácido nucleico (por ejemplo, una diana de proteína) en una muestra en ensayo detectando y cuantificando un ácido nucleico (es decir, un aptámero). Los métodos descritos crean un sustituto de ácido nucleico (es decir, el aptámero) para detectar y cuantificar una diana de ácido nucleico, permitiendo, de este modo, la amplia variedad de tecnologías de ácido nucleico, incluyendo la amplificación, a aplicar a un intervalo más amplio de dianas deseadas, incluidas dianas de proteína.

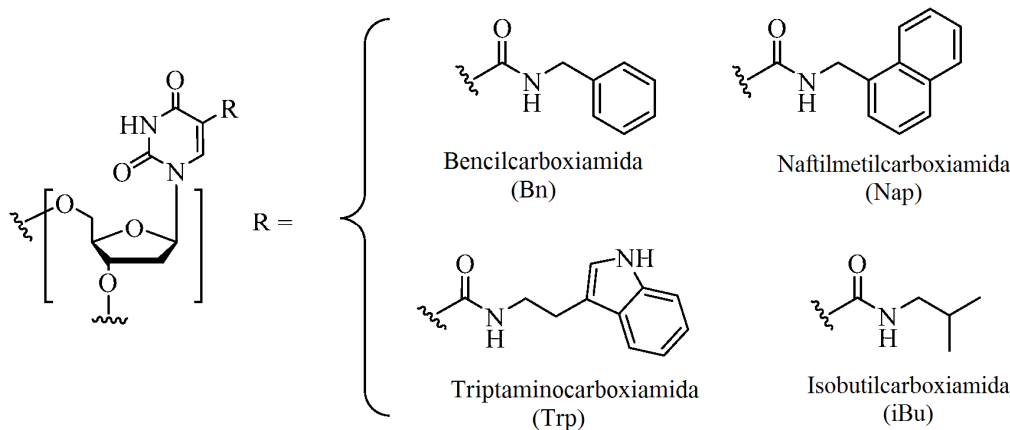
Se describen realizaciones del proceso SELEX en donde la diana es un péptido en la patente de Estados Unidos n.º 6.376.190, titulada "Modified SELEX Processes Without Purified Protein."

Modificaciones químicas a aptámeros

Los aptámeros pueden contener nucleótidos modificados que mejoran sus propiedades y características. Los ejemplos no limitantes de tales mejoras incluyen, estabilidad *in vivo*, estabilidad frente a la degradación, afinidad de unión para su diana y/o características de suministro mejoradas.

Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en la ribosa y/o fosfato y/o posiciones de base de un nucleótido. Se describen aptámeros identificados con el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados en la patente de Estados Unidos n.º 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. patente estadounidense n.º 5.580.737, véase más arriba, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090098549, titulada "SELEX" y "PHOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades químicas y físicas expandidas y su uso en SELEX y photoSELEX.

Ejemplos específicos de una modificación en el C-5 incluyen sustitución de deoxiuridina en la posición en el C-5 con un sustituyente independientemente seleccionada entre: bencilcarboxiamida (alternativamente bencilaminocarbonilo) (Bn), naftilmetilcarboxiamida (alternativamente naftilmetilaminocarbonilo) (Nap), triptaminocarboxiamida (alternativamente triptaminocarbonilo) (Trp) e isobutilcarboximida (alternativamente isobutilaminocarbonilo) (iBu) tal como se ilustra inmediatamente a continuación.

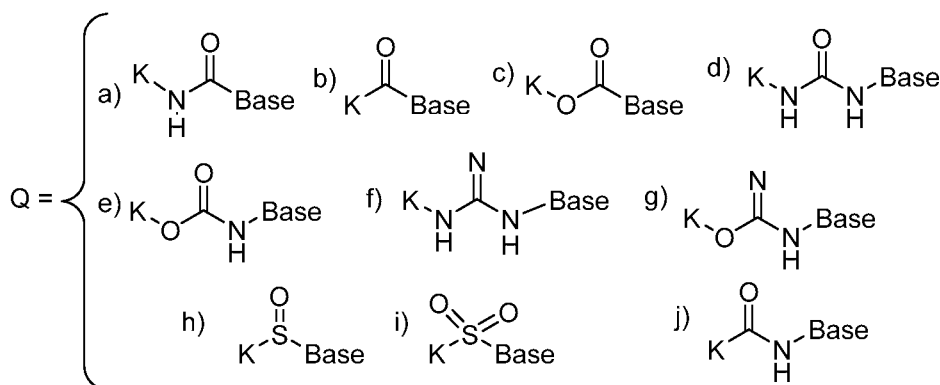
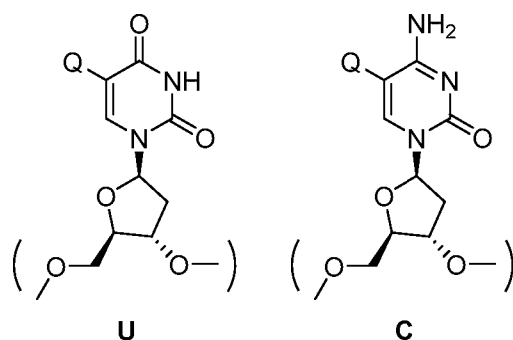


5 Ejemplos específicos de una modificación en el C-5 incluyen sustitución de modificaciones químicas de desoxiuridina de una pirimidina modificada en el C-5 también pueden combinarse con, individualmente o en cualquier combinación, modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones en aminas exocíclicas y sustitución de 4-tiouridina y similares.

10 Las pirimidinas modificadas en el C-5 representativas incluyen: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina.

15 Si está presente, pueden impartirse una modificación a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polinucleótido. Se puede interrumpir una secuencia de nucleótidos mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de etiquetado.

20 Ejemplos no limitantes adicionales de nucleótidos modificados (por ejemplo, pirimidina modificada en el C-5) que pueden incorporarse en las secuencias de ácidos nucleicos de la presente divulgación incluyen los siguientes:

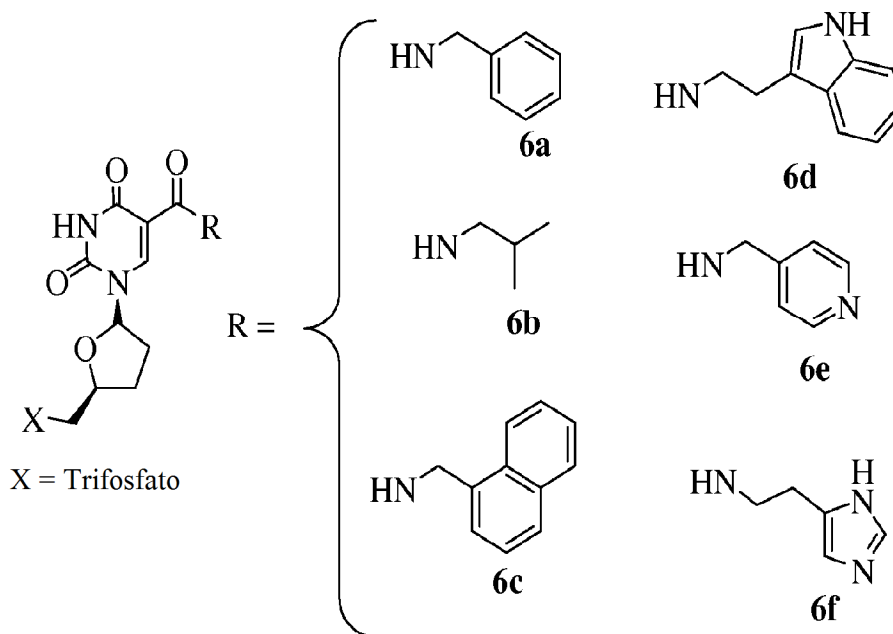


R^{'''} se selecciona entre el grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; hidroxilo (OH), halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO₂H₂); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico (COOR^{''}); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR^{''}); amida terciaria (CONR^{''}R^{'''}); sulfonamida (SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR^{''});
 5 en donde

R^{''}, R^{'''} se seleccionan independientemente entre un grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C2) ramificado o lineal; fenilo (C₆H₅); un anillo fenilo sustituido con R^{'''} (R^{'''}C₆H₄); en donde R^{''''} se ha definido anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico (COOR^{''''}); en la que R^{''''} es un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; y cicloalquilo; en donde R^{''} = R^{'''} = (CH₂)_n;

en donde n = 2-10.

Además, los nucleótidos de pirimidina modificada en el C-5 incluyen lo siguiente:



En algunas realizaciones, el nucleótido modificado confiere resistencia a nucleasa al oligonucleótido. Una pirimidina con una sustitución en la posición C-5 es un ejemplo de un nucleótido modificado. Modificaciones pueden incluir modificaciones de cadena principal, metilaciones, combinaciones de emparejamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como la protección. Otras modificaciones pueden incluir sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y aquellas con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquilantes y aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos, alfa anoméricos, etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en el azúcar de un nucleótido puede reemplazarse por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse mediante grupos de protección estándar; o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH terminales 5' y 3' se pueden fosforilar o sustituir con aminas, restos de grupos de protección orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímeros de polietilenglicol (PEG) en una realización que varían de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 kDa, polímeros de PEG en otra realización que varían de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 kDa u otros polímeros sintéticos o biológicos hidrófobos o hidrófilos. En una realización, las modificaciones son de la posición C-5 de pirimidinas. Estas modificaciones pueden producirse mediante un enlace de amida directamente en la posición C-5 o mediante otros tipos de enlaces.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son normalmente conocidos en la técnica, incluyendo 2'-O-metilo-, 2'-O-alilo-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos, tales arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como ribósido de metilo. Como se ha señalado anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por

grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en donde el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en donde cada R o R' son independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, al igual que las estructuras de cadena principal alternativas como una cadena principal de poliamida, por ejemplo.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características particulares y/o realizaciones. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la divulgación a las características particulares o realizaciones descritas.

***Staphylococcus aureus* (también denominado en el presente documento como *S. aureus*)**

La tinción de antígenos de superficie para la microscopía de inmunofluorescencia ha demostrado el uso de conjugados de anticuerpo-fósforo para detectar números relativamente bajos de células de *S. aureus* cells con el tiempo en modelos de infección *in vivo* (Timofeyeva et al., 2014). Se han identificado péptidos cortos como ligandos específicos de la superficie celular de *S. aureus* mediante expresión en fago y un péptido de consenso sintético (SA5-1) fue capaz de detectar aproximadamente 100 UFC ml⁻¹ en una muestra biológica con adiciones usando puntos cuánticos fluorescentes (Rao et al. (2013).

Los grupos principales son los MSCRAMM (Componentes de superficie microbianos que reconocen moléculas de matriz adhesivas), las SERAM (repertorio expandido de moléculas adhesivas secretables), así como otras toxinas extracelulares y factores de evasión inmune (Gill et al. (2005); Speziale et al., 2009). Es posible usar células bacterianas completas para SELEX (Cao et al. (2009), o proteínas asociadas a superficie extraídas a partir de células con LiCl, lisostafina o 2 % de SDS (Palma et al. (1998); Hussain et al., 2001; Roche et al., 2003), o liberadas por rasurado de tripsina (Ythier et al., 2012). Sin embargo, La composición del proteoma de superficie *in vitro* varía entre distintas cepas y depende del medio y la fase de crecimiento. Asimismo, los estafilococos distintos a *S. aureus* expresan proteínas estrechamente relacionadas, que pueden impedir el aislamiento de reactivos específicos a especies sin una contra-selección cuidadosa. Por lo tanto, escogemos centrarnos en proteínas de superficie celular específicas de *S. aureus* bien conservadas que son conocidas por expresarse en abundancia en la mayoría de condiciones de crecimiento y produjimos estas dianas de SELEX en forma recombinante.

Las proteínas que están expuestas sobre la superficie celular de *S. aureus* pueden interactuar directamente con moléculas extracelulares, incluidos fármacos y anticuerpos, y estas adhesiones o proteínas de evasión inmune representan dianas candidato de vacunas (Stranger-Jones et al., 2006; McCarthy y Lindsay, 2010; Dreisbach et al., 2011). La envoltura celular de *S. aureus*, las proteínas asociadas a la pared celular y mecanismos para la unión celular, son bastante bien entendidos (Dreisbach et al., 2011). La comparación de secuencias genómicas completas de 58 cepas de *S. aureus*, sin embargo, reveló variaciones en proteínas implicadas en la adhesión o evasión de respuesta inmune o proteínas que falta o están truncadas en determinadas cepas (McCarthy y Lindsay, 2010). Las adhesinas incluyen una familia de proteínas de superficie covalentemente unidas al peptidoglicano a través de un motivo de LPXTG conservado (Schneewind et al., 1995). El perfilado proteómico y transcriptómico de proteínas de superficie ha demostrado correlacionarse bien con fenotipos de adherencia en *S. aureus* (Roche et al., 2003; Ythier et al., 2012).

Las diez proteínas asociadas a superficie para las cuales hemos generados los aptámeros incluyen SpA, ClfA, ClfB, FnbA, FnbB, SasD, IsdA, IsdB, IsdC e IsdH. Todas estas proteínas están unidas a la pared celular a través de escisión mediada por sortasa entre la tronina y la glicina de el motivo de sortasa de LPCTG y se vuelven enlazadas a amina para el puente transversal de pantaglicina de peptidoglicano (Marraffini et al., 2006). Puesto que nuestro objetivo era obtener agentes de unión a células de *S. aureus*, produjimos proteínas recombinantes que representan dominios expuestos a superficie pero carecen de secuencias de señal y las regiones de repetición del dominio incrustado de pared celular. La proteína A de *S. aureus* (SpA) está presente sobre la superficie bacteriana así como secretada en el medio extracelular. La SpA es un factor de evasión inmune potente puesto que une la región de la región de Fc de anticuerpos y las regiones Fab del receptor de linfocitos B (IgM), bloqueando, de este modo, la opsonofagocitosis y causando la muerte de linfocitos B (Falugi et al., 2013; Kobayashi y Deleo, 2013). Puesto que la SpA están bien conservada entre *S. aureus* pero está ausente en estafilococos no patogénicos tales como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*, esta proteína representa una diana de diagnóstico atractiva. Los aislados clínicos con variantes de SpA truncadas se ha descrito que carecen de la región XC con la señal de clasificación de terminal C y se encuentran, por lo tanto, principalmente extracelulares (Sorum et al., 2013). ClfA y ClfB son proteínas de unión de fibrinógenos relacionadas estructuralmente (McDevitt et al., 1997; Ni Eidhin et al., 1998). ClfB es uno de los factores clave responsables de la adhesión a células epiteliales descamadas de los nares anteriores y se produce normalmente durante la fase de crecimiento exponencial temprana (Ni Eidhin et al., 1998). FnbA y FnbB se adhieren a componentes de la matriz extracelular, tanto fibronectina como elastina y son importantes para la colonización de tejidos huésped durante la infección Roche et al. (2004). SasD es una proteína de adhesión putativa con un papel fisiológico desconocido (Roche et al., 2003 Ythier et al., 2012). Cuatro de las proteínas pertenecen al sistema determinante de superficie sensible a hierro (Isd) que se introduce en *S. aureus* en condiciones limitantes de hierro y es importante para la captura de hemo a partir de hemoglobina (IsdB, IsdH) y su transporte (IsdA, IsdC) por toda la pared celular

(Mazmanian *et al.*, 2003; Grigg *et al.*, 2010).

Como concepto de prueba y para evaluar su eficacia, los aptámeros generados frente a proteínas asociadas a superficie celular de *S. aureus* se usaron para capturar y detectar *S. aureus* usando qPCR y también para detectar directamente las células mediante citometría de flujo.

Los reactivos de SOMAmer (aptámero modificado con tasa de disociación lenta) están producidos a partir de ADN unicationario (ssADN) que contiene restos de pirimidina modificada en su posición de cebador 5 con imitación de cadenas laterales de aminoácidos y tiene tasas de disociación bastante largas (>30 min) (Gold *et al.*, 2010). Estas características llevan a una mejor afinidad y mejores propiedades cinéticas de los aptámeros en comparación con aptámeros de ARN o ADN estándar. Se puede usar prácticamente cualquier proteína para SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento potencial) para generar aptámeros específicos, de alta afinidad en múltiples rondas de selección con desafío cinético, particionamiento y amplificación a partir de una biblioteca al azar o ssADN modificado (Gold *et al.*, 2010; Vaught *et al.*, 2010). Las ventajas de aptámeros sobre los anticuerpos incluyen termoestabilidad excepcional en solución, bajo peso molecular, capacidades de multiplexación superiores, estabilidad química al calor, secado y disolventes, renaturalización reversible, facilidad de fabricación de reactivo, consistencia con rendimiento con lote-a-lote y costes inferiores. Los aptámeros se han generado a >1000 proteínas humanas y son la base de la plataforma proteómica de SOMAScan™ desarrollada por SomaLogic para medir estas proteínas simultáneamente y con una elevada precisión en una pequeña muestra de sangre (0,1 ml). La aplicación de este ensayo altamente multiplexado ha llevado al descubrimiento de biomarcadores en diversas áreas de medicina (Gold *et al.*, 2012). Con respecto a las proteínas microbianas, hemos dado a conocer previamente la caracterización de los aptámeros para toxinas de *Clostridium difficile* y se ha mostrado la amplia gama de aplicaciones potenciales de estos agentes de unión (Ochsner *et al.*, 2013; US2012231467).

Se generaron reactivos de aptámeros modificados con una tasa de disociación lenta (reactivo de SOMAmer) a varias proteínas asociadas a la superficie celular de *Staphylococcus aureus* a través de SELEX con múltiples bibliotecas de ADN modificadas usando proteínas recombinantes o nativas purificadas. Se obtuvieron agentes de unión de alta afinidad con K_d sub-nanomolares para la proteína A estafilocócica (SpA), factores de aglutinación (ClfA, ClfB), proteínas de unión a la fibronectina (FnbA, FnbB) y determinantes de superficie regulados por hierro (Isd). Un cribado adicional reveló varios aptámeros específicamente unidos a células de *S. aureus* a partir de todas las cepas, pero no a otros estafilococos u otras bacterias. Los aptámeros de SpA y ClfA mostraron ser útiles para la captura selectiva y enriquecimiento de células de *S. aureus* a partir de matrices de baja densidad celular, tal como se muestra mediante cultivo y PCR, conduciendo a límites mejoradas de detección y retirada eficaz de inhibidores de PCR. La detección de células de *S. aureus* se potenció por varios órdenes de magnitud cuando la superficie celular bacteriana se recubrió con aptámeros seguida por qPCR de los aptámeros. Asimismo, los aptámeros de SpA marcados con fluorescencia demostraron su utilidad como agentes de detección en citometría de flujo.

Kits que comprenden composiciones de aptámeros

La presente divulgación proporciona kits que comprenden cualquiera de los aptámeros descritos en el presente documento. Tales kits pueden comprender, por ejemplo, (1) al menos un aptámero que se une a una diana; y (2) al menos un transportador farmacéuticamente aceptable, tal como un disolvente o una solución. Componentes del kit adicionales pueden incluir opcionalmente, por ejemplo: (1) cualquiera de los excipientes farmacéuticamente aceptables identificados en el presente documento, tales como estabilizadores, tampones, etc., (2) al menos un recipiente, vial o aparato similar para mantener y/o mezclar los componentes del kit; y (3) aparato de suministro.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona una secuencia de aptámeros que se une a la proteína de SPA representada por la SEQ ID NO: 9. La secuencia de nucleótidos puede generalizarse adicionalmente a la siguiente secuencia: GGCWWCGGGWACCWAWWWAWNGGWWWAGCC(N)_nGWC (SEQ ID NO: 14) en donde "W" en la secuencia representa una posición que puede ser ocupada por una pirimidina modificada en el C-5, y "N" representa una posición que puede ser ocupada por cualquier nucleótido no modificado o modificado, y n es de 0 a 2 (o 0, 1 o 2).

En otro aspecto, N es una C, T, G o A. En otro aspecto, N es una C, T o A.

En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta aproximadamente 100 nucleótidos, hasta aproximadamente 95 nucleótidos, hasta aproximadamente 90 nucleótidos, hasta aproximadamente 85 nucleótidos, hasta aproximadamente 80 nucleótidos, hasta aproximadamente 75 nucleótidos, hasta aproximadamente 70 nucleótidos, hasta aproximadamente 65 nucleótidos, hasta aproximadamente 60 nucleótidos, hasta aproximadamente 55 nucleótidos, hasta aproximadamente 50 nucleótidos, hasta aproximadamente 45 nucleótidos, hasta aproximadamente 40 nucleótidos.

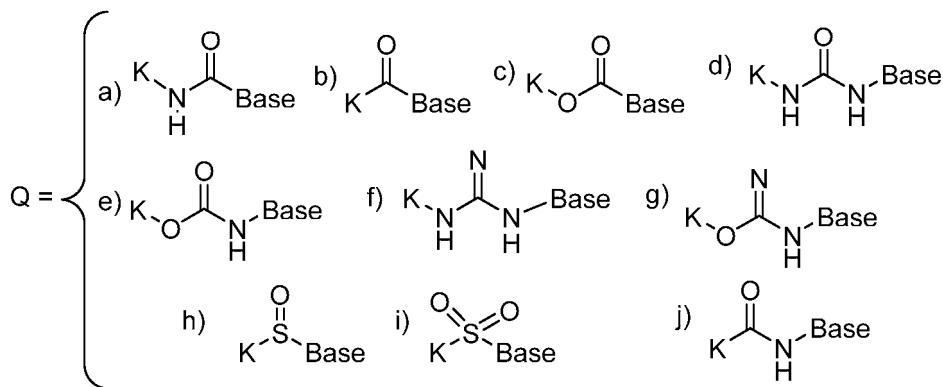
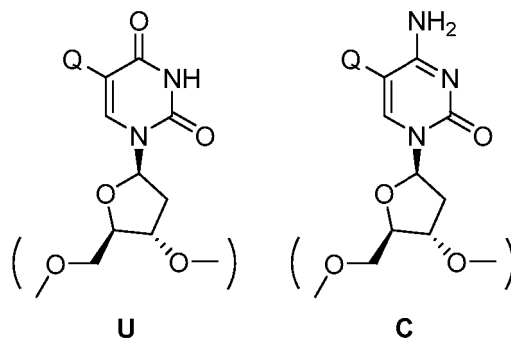
En otro aspecto de esta divulgación, el aptámero puede ser al menos aproximadamente el 95 % idéntico, al menos aproximadamente el 90 % idéntico, al menos aproximadamente el 85 % idéntico, al menos aproximadamente el 80 % idéntico o al menos aproximadamente el 75 % idéntico a cualquiera de la SEQ ID NO: 14. En otra realización, el aptámero incluye fragmentos de secuencia de la SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente de 1 a 50 (o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50) pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde 5 a 30 (o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde 10 a 15 (o de 10, 11, 12, 13, 14 o 15) de pirimidinas modificadas en el C-5.

En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 1 % al 100 % (o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 50 % (o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 40 % (o 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 35 % (o 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 27 % a aproximadamente el 33 % (o 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 37 % a aproximadamente el 43 % (o 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 % de pirimidinas modificadas en el C-5.

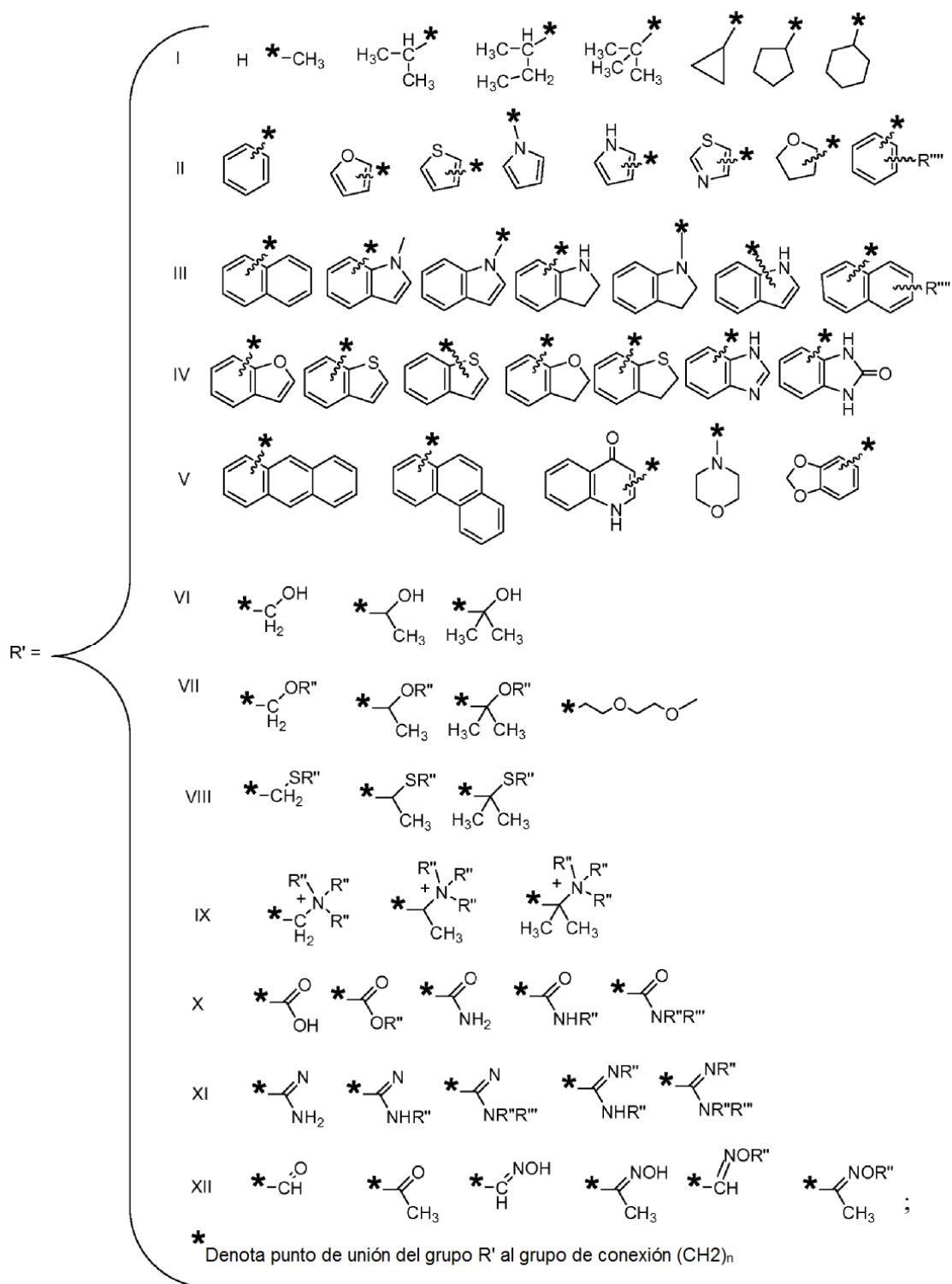
En otro aspecto, W puede representar una uridina o citidina modificada en el C-5.

En otro aspecto, W puede representar una pirimidina modificada en el C-5 ilustrada inmediatamente a continuación:



Base = Uridina (U) o Citidina (C) (la unión se encuentra en la posición 5)
K = grupo R' más grupo de conexión de (CH₂)_n, en donde n = 0-3;

en donde R' se define del siguiente modo:



en donde

5 R''' se selecciona entre el grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; hidroxilo (OH), halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO₂H₂); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico (COOR''); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR''); amida terciaria (CONR''R'''); sulfonamida (SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR''); en donde

10 R'', R''' se seleccionan independientemente entre un grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C2) ramificado o lineal; fenilo (C₆H₅); un anillo fenilo sustituido con R'''' (R''''C₆H₄); en donde R'''' se ha definido anteriormente; un

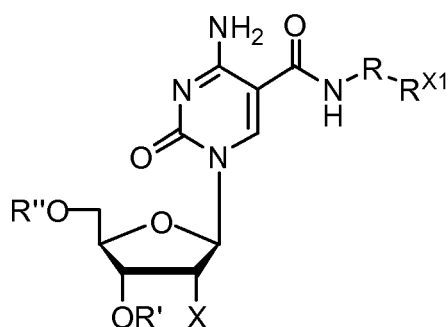
ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico (COOR'''''); en la que R'''' es un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; y cicloalquilo; en donde R'' = R''' = (CH₂)_n;

en donde n = 2-10.

5 En otro aspecto, W puede representar una pirimidina modificada en el C-5 seleccionada a partir del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), una 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), una 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), una 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU) y una combinación de los mismos.

10 En otro aspecto, W representa una pirimidina modificada en el C-5 seleccionada a partir del grupo que consiste en una 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU) y una 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU) y una combinación de los mismos.

15 En otro aspecto, W puede representar un compuesto que comprende la estructura que se muestra en la Fórmula I:

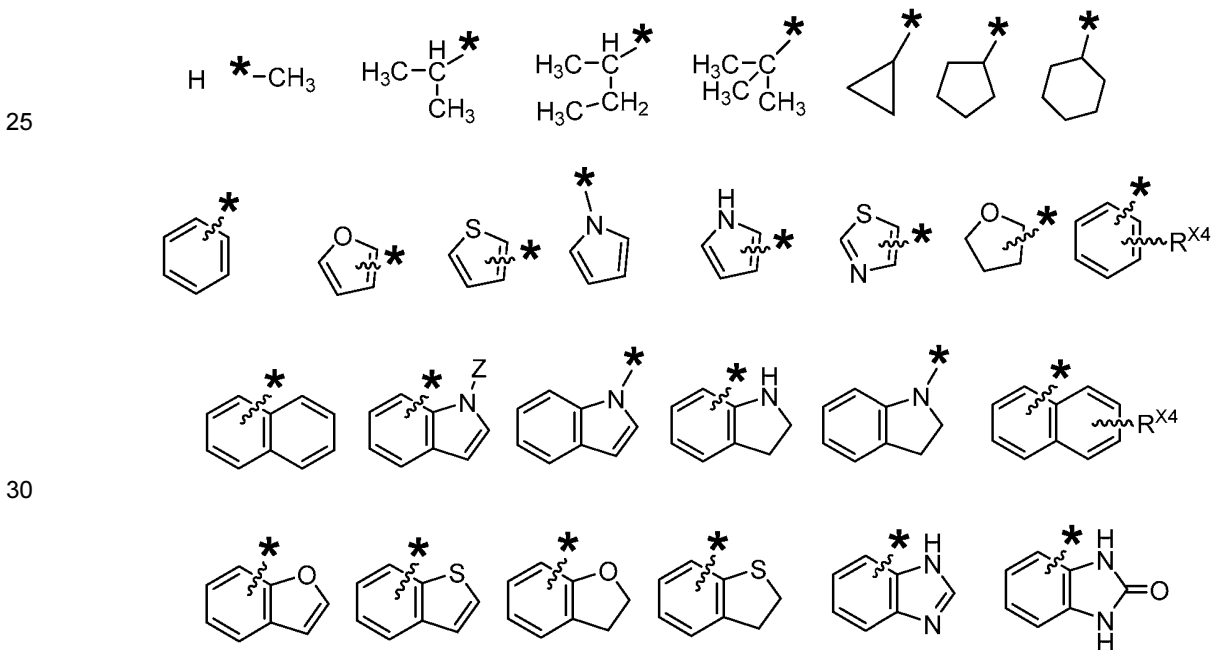


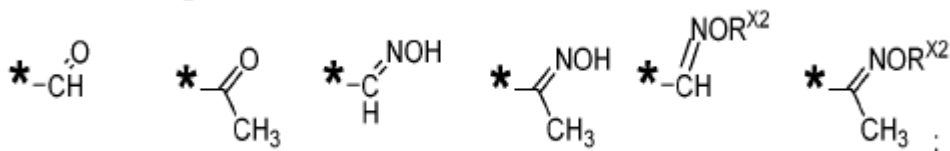
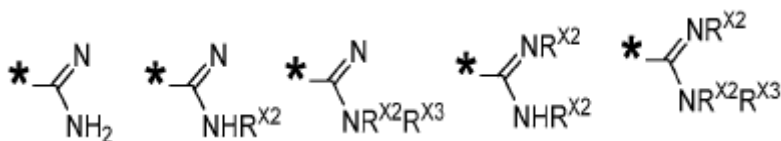
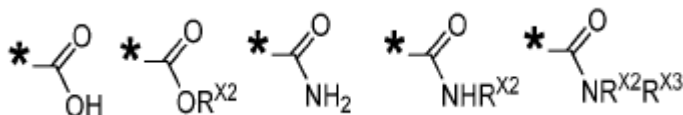
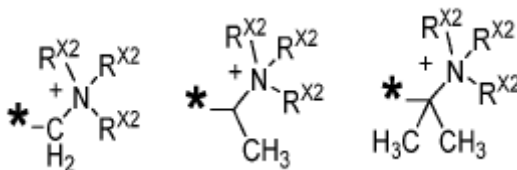
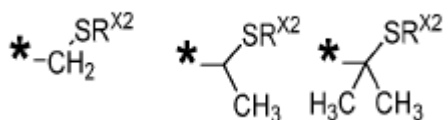
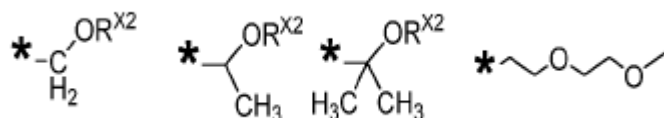
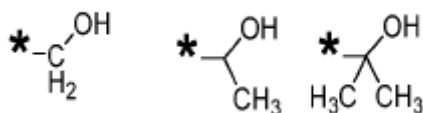
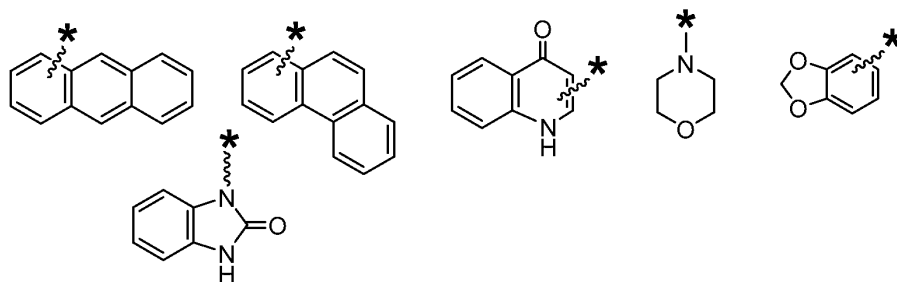
Fórmula I

en donde

20 R es independientemente un -(CH₂)_n-, en donde n es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

R^{X1} se selecciona independientemente del grupo que consiste en:





5

10 en donde * denota el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo $-(CH_2)_n-$; y en donde

15 R^{X4} se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal sustituido o no sustituido; un grupo hidroxilo; un halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO_2H_2); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico ($COOR^{X2}$); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR^{X2}); amida terciaria (CONR^{X2}R^{X3}); sulfonamida (SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR^{X2}); R^{X2} y R^{X3} son independientemente, por cada aparición, seleccionados del grupo que consiste en un alquilo (C1-C20) inferior lineal o ramificado sustituido o no sustituido; fenilo (C₆H₅); un anillo fenilo sustituido con R^{X4} ($R^{X4}C_6H_4$), en la que R^{X4} se ha definido anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico ($COOR^{X5}$), en la que R^{X5} es un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; y cicloalquilo, en donde R^{X2} y R^{X3} juntos forman un anillo de 5 o 6 miembros sustituido o no sustituido;

20 X se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -

OCH₂CH₂OCH₃, -NH₂ y -azido;

R¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un -H, -OAc; -OBz; -P(NiPr₂)(OCH₂CH₂CN); y -OSiMe₂tBu;

5 Rⁿ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un hidrógeno, 4,4'-dimetoxitritilo (DMT) y trifosfato (-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)₂) o una sal de los mismos;

Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un -H, un alquilo inferior (C1-C4) ramificado o lineal sustituido o no sustituido;

10 y sales de los mismos;

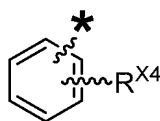
con las siguientes excepciones:

cuando n = 4, entonces R^{X1} no puede ser H;

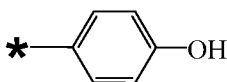
cuando n = 3, entonces R^{X1} no puede ser CH₃;

cuando n = 0, entonces R^{X1} no puede ser -CH(CH₃)₂; y

15 cuando n = 2, y R^{X1} es

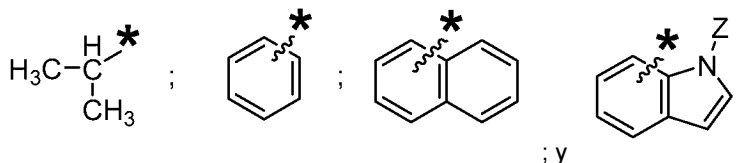


20 y R^{X4} es hidroxilo entonces R^{X1} no puede ser



En un aspecto relacionado n es un número entero seleccionado de 1, 2 o 3.

25 En un aspecto relacionado, R^{X1} se selecciona entre el grupo que consiste en:



30 en donde

* denota el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo -(CH₂)_n; y

Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un -H, un alquilo inferior (C1-C4) ramificado o lineal sustituido o no sustituido.

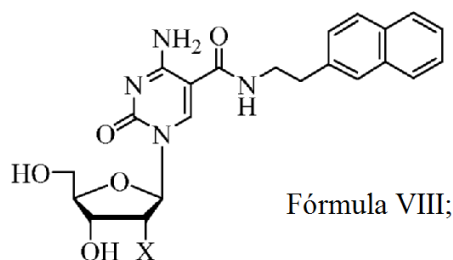
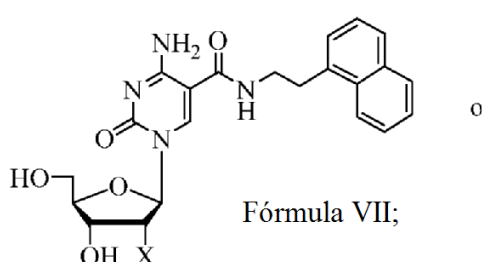
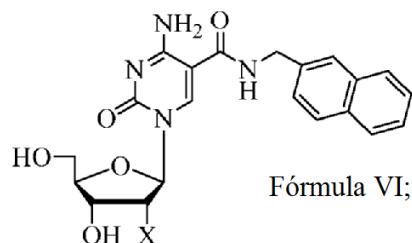
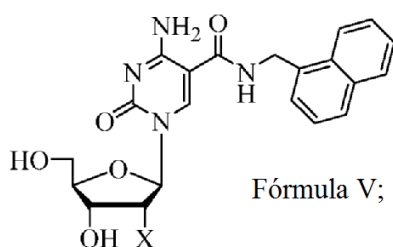
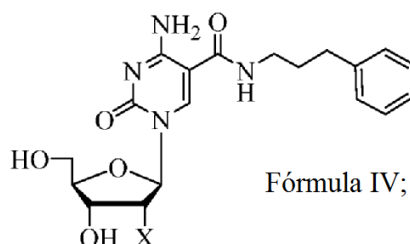
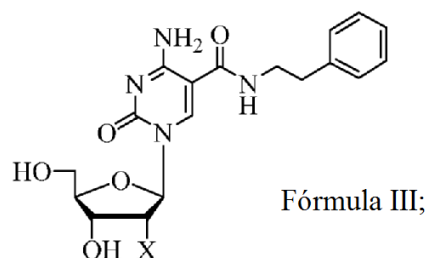
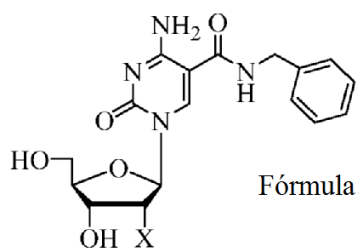
35 En un aspecto relacionado, R^{X4} se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C6) ramificado o lineal; -OH; -F y ácido carboxílico (COOH).

En un aspecto relacionado, X se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe y -F.

40 En un aspecto relacionado, R¹ se selecciona entre el grupo que consiste en un -H, -OAc y -P(NiPr₂)(OCH₂CH₂CN).

En un aspecto relacionado, Rⁿ es un trifosfato (-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)₂).

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto que comprende la estructura seleccionada del grupo que consiste en las Fórmulas II (BndC), III (PEdC), IV (PPdC), V (NapdC), VI (2NapdC), VII (NEdC) y VIII (2NEdC):



en donde

- 5 X se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-aliilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃, -NH₂ y -azido.

En otro aspecto de esta divulgación, el aptámero puede tener una constante de disociación (K_d) para su diana de aproximadamente 10 nM o inferior. En otra realización de ejemplo, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 15 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 20 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 25 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 30 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 35 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 40 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 45 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 50 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana en un intervalo de aproximadamente 3-10 nM (o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nM). Puede determinarse una constante de disociación adecuada con un ensayo de unión usando una titulación multipunto y ajustando la ecuación $y = (\text{máx} - \text{min})(\text{Proteína}) / (K_d + \text{Proteína}) + \text{min}$. Debe entenderse que la determinación de constantes de disociación depende en gran medida de las condiciones que las que se miden y, por lo tanto, estos números pueden variar significativamente con respecto a otros factores tales como tiempo de equilibrio, etc. En otras realizaciones, el aptámero tiene una K_d que es inferior o igual a la K_d de un aptámero seleccionado entre las SEQ ID NO: 1-15.

El motivo de la secuencia de aptámeros que se une a la proteína ClfA se representa por la SEQ ID NO: 13. Este motivo de secuencia puede generalizarse adicionalmente a la siguiente secuencia:
 AWCWGGWWC(N)_nAWCWGGWWWWWAAG (SEQ ID NO: 15)

5 La "W" en la secuencia representa una posición que puede ser ocupada por una pirimidina modificada en el C-5, y "N" representa una posición que puede ser ocupada por cualquier nucleótido no modificado o modificado o una secuencia de separación o enlazador. Además, n puede ser un número de 1 a 30 (o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30), o de 2 a 20 (o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20), o de 5 a 18 (o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18), o de 10 a 16 (o 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16), o N es aproximadamente 16.

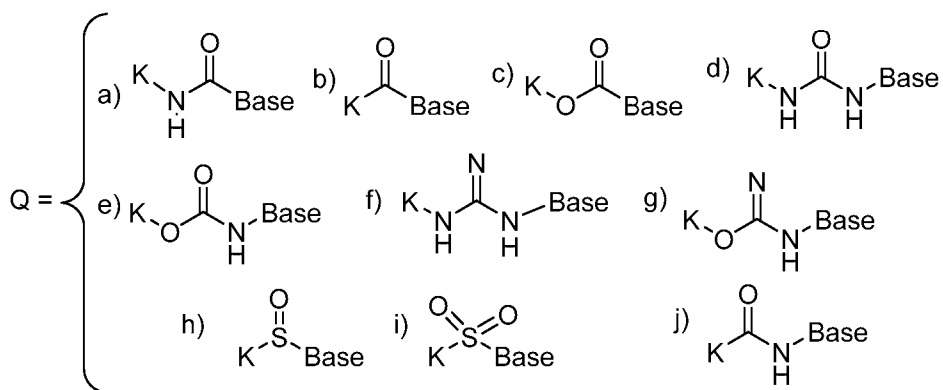
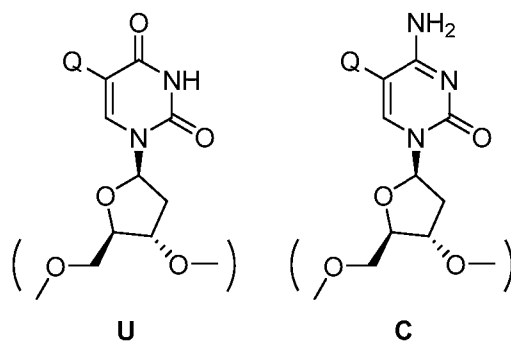
15 En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta aproximadamente 100 nucleótidos, hasta aproximadamente 95 nucleótidos, hasta aproximadamente 90 nucleótidos, hasta aproximadamente 85 nucleótidos, hasta aproximadamente 80 nucleótidos, hasta aproximadamente 75 nucleótidos, hasta aproximadamente 70 nucleótidos, hasta aproximadamente 65 nucleótidos, hasta aproximadamente 60 nucleótidos, hasta aproximadamente 55 nucleótidos, hasta aproximadamente 50 nucleótidos, hasta aproximadamente 45 nucleótidos, hasta aproximadamente 40 nucleótidos, hasta aproximadamente 35 nucleótidos, hasta aproximadamente 30 nucleótidos, hasta aproximadamente 25 nucleótidos y hasta aproximadamente 20 nucleótidos.

20 En otro aspecto de esta divulgación, el aptámero puede ser al menos aproximadamente el 95 % idéntico, al menos aproximadamente el 90 % idéntico, al menos aproximadamente el 85 % idéntico, al menos aproximadamente 80 % idéntico o al menos aproximadamente 75 % idéntico a cualquiera de la SEQ ID NO: 15. En otra realización, el aptámero incluye fragmentos de secuencia de la SEQ ID NO: 15.

25 En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 1 % al 100 % (o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 50 % (o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende, desde aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 40 % (o 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 35 % (o 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 27 % a aproximadamente el 33 % (o 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 %) de pirimidinas modificadas en el C-5. En otro aspecto, el aptámero comprende desde aproximadamente el 37 % a aproximadamente el 43 % (o 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 % de pirimidinas modificadas en el C-5.

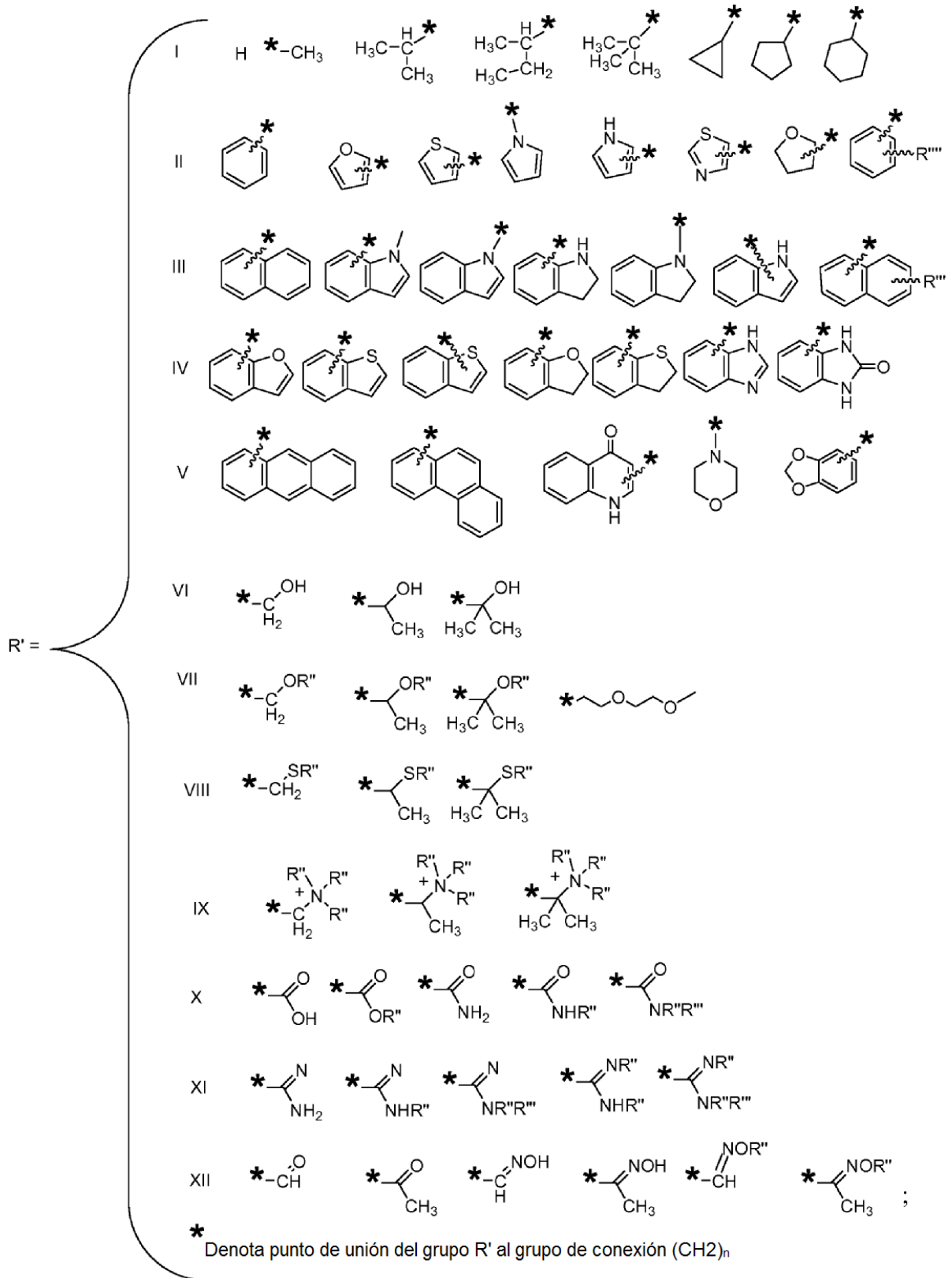
40 En otro aspecto, la W puede representar una uridina o citidina modificada en el C-5.

En otro aspecto, el W puede representar una pirimidina modificada en el C-5 ilustrada inmediatamente a continuación:



Base = Uridina (U) o Citidina (C) (la unión se encuentra en la posición 5)
 K = grupo R' más grupo de conexión de (CH₂)_n, en donde n = 0-3

5 en donde R' se define del siguiente modo:



en donde

- 5 R''' se selecciona entre el grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; hidroxilo (OH), halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO₂H₂); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico (COOR''); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR''); amida terciaria (CONR''R'''); sulfonamida

(SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR^{''});

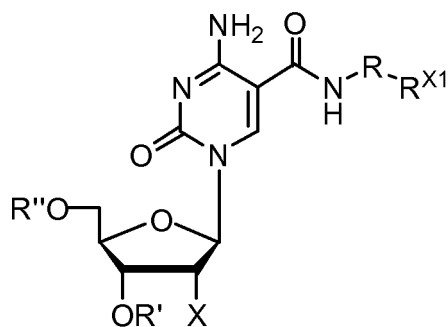
en donde

5 R^{''}, R^{'''} se seleccionan independientemente entre un grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C2) ramificado o lineal; fenilo (C₆H₅); un anillo fenilo sustituido con R^{''''} (R^{''''}C₆H₄); en donde R^{''''} se ha definido anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico (COOR^{''''}); en la que R^{''''} es un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; y cicloalquilo; en donde R^{''} = R^{'''} = (CH₂)_n;

10 en donde n = 2-10.

En otro aspecto, la W puede representar una pirimidina modificada en el C-5 seleccionada a partir del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), una 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), una 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), una 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU) y una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la W puede representar una pirimidina modificada en el C-5 seleccionada a partir del grupo que consiste en una 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU) y una 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU) y una combinación de los mismos. En otro aspecto, la W puede representar un compuesto que comprende la estructura que se muestra en la Fórmula I:

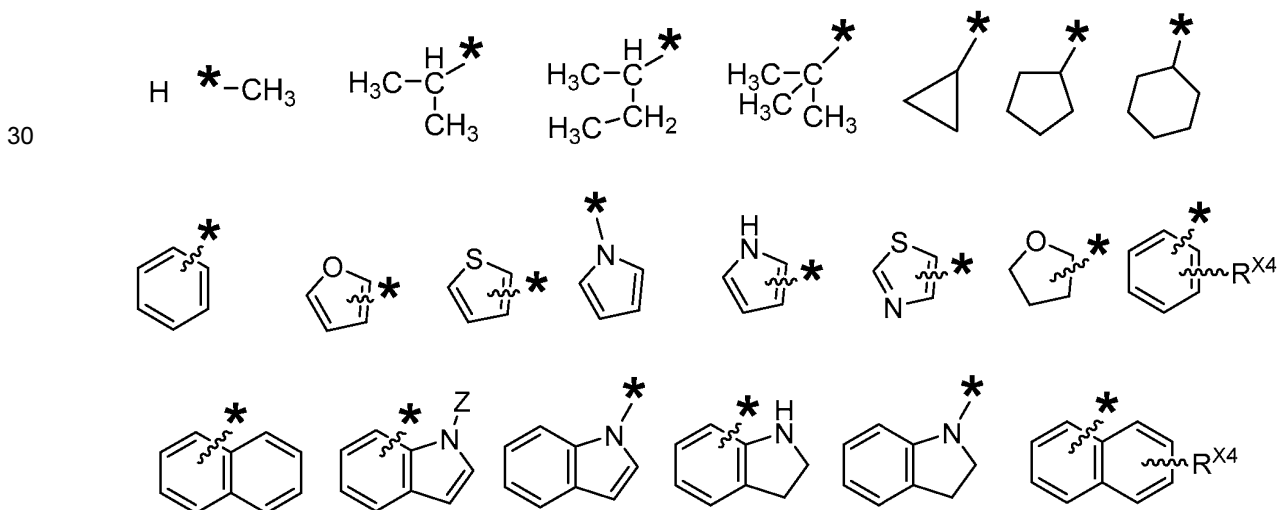


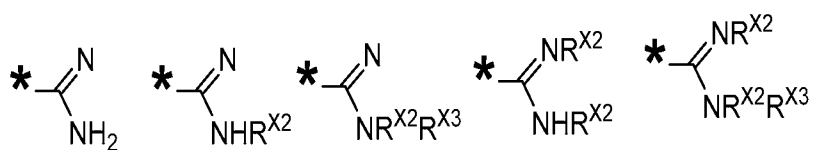
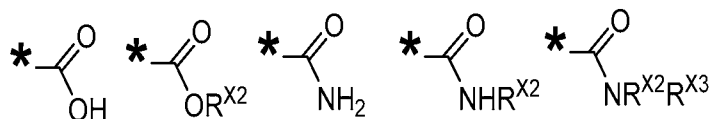
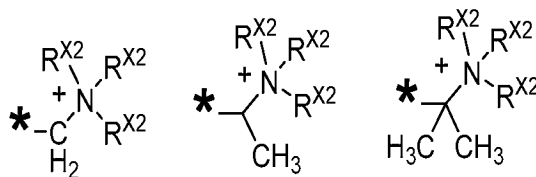
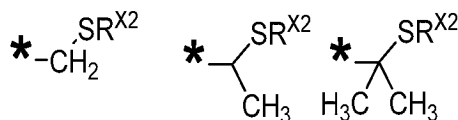
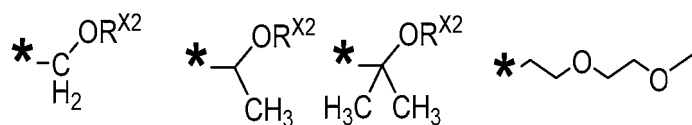
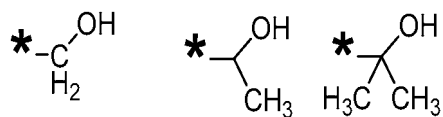
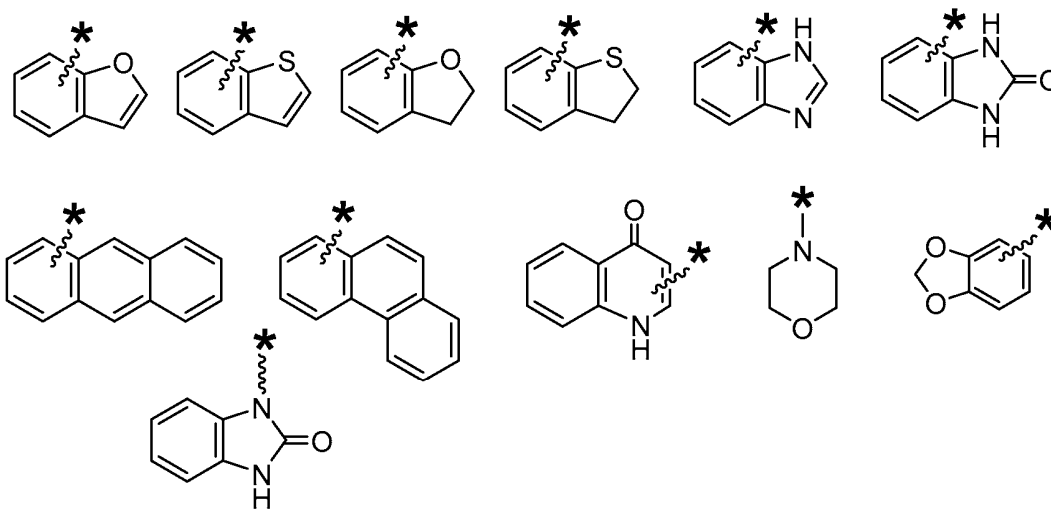
Fórmula I

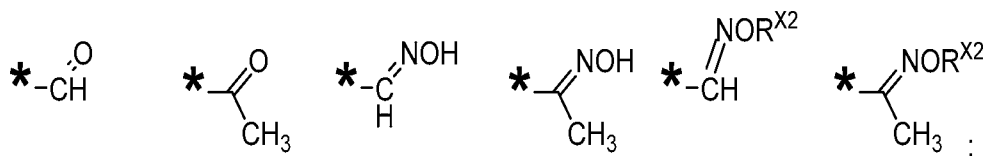
en donde

25 R es independientemente un -(CH₂)_n-, en donde n es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

R^{X1} se selecciona independientemente del grupo que consiste en:







en donde * denota el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo $-(CH_2)_n-$; y en donde R^{X4} se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal sustituido o no sustituido; un grupo hidroxilo; un halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO_2H_2); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico ($COOR^{X2}$); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR^{X2}); amida terciaria (CONR^{X2}R^{X3}); sulfonamida (SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR^{X2});

R^{X2} y R^{X3} son independientemente, por cada aparición, seleccionados del grupo que consiste en un alquilo (C1-C20) inferior lineal o ramificado sustituido o no sustituido; fenilo (C₆H₅); un anillo fenilo sustituido con R^{X4} ($R^{X4}C_6H_4$), en la que R^{X4} se ha definido anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico ($COOR^{X5}$), en la que R^{X5} es un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; y cicloalquilo, en donde R^{X2} y R^{X3} juntos forman un anillo de 5 o 6 miembros sustituido o no sustituido;

X se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃, -NH₂ y -azido;

R¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un -H, -OAc; -OBz; -P(NiPr₂)(OCH₂CH₂CN); y -OSiMe₂tBu;

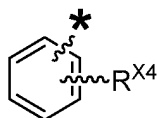
Rⁿ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un hidrógeno, 4,4'-dimetoxitritilo (DMT) y trifosfato (-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)₂) o una sal de los mismos;

Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un -H, un alquilo inferior (C1-C4) ramificado o lineal sustituido o no sustituido;

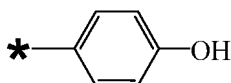
y sales de los mismos;

con las siguientes excepciones:

- cuando $n = 4$, entonces R^{X1} no puede ser H;
- cuando $n = 3$, entonces R^{X1} no puede ser CH₃;
- cuando $n = 0$, entonces R^{X1} no puede ser -CH(CH₃)₂; y
- cuando $n = 2$, y R^{X1} es

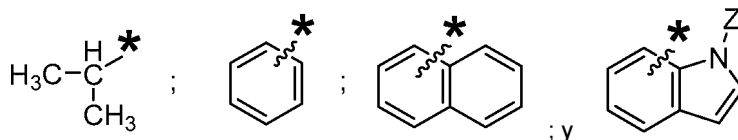


y R^{X4} es hidroxilo entonces R^{X1} no puede ser



En un aspecto relacionado n es un número entero seleccionado de 1, 2 o 3.

En un aspecto relacionado, R^{X1} se selecciona entre el grupo que consiste en:



en donde

* denota el punto de unión del grupo R^{X1} al grupo $-(CH_2)_n-$; y

Z se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un -H, un alquilo inferior (C1-C4) ramificado o lineal sustituido o no sustituido.

En un aspecto relacionado, R^{X4} se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un alquilo inferior

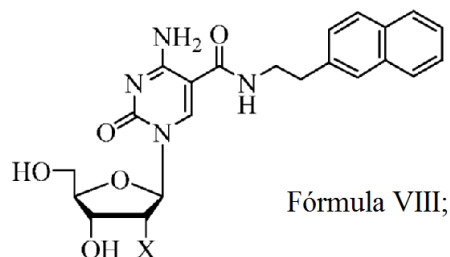
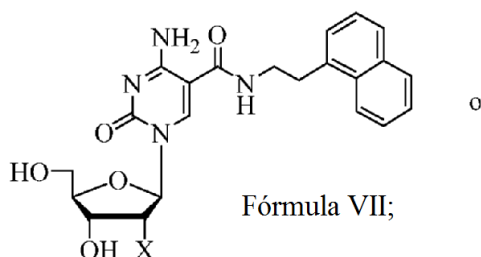
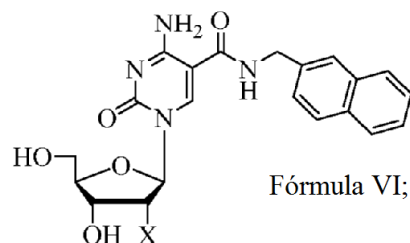
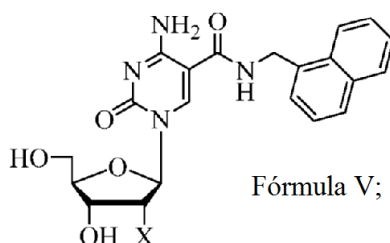
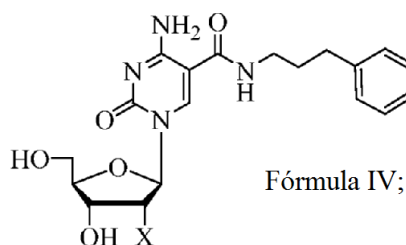
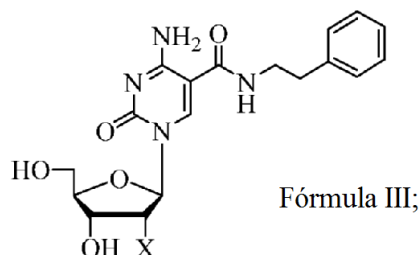
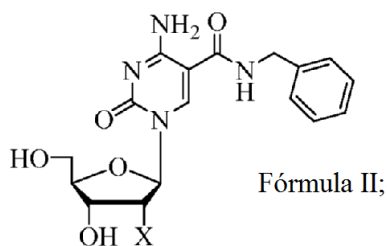
(C1-C6) ramificado o lineal; -OH; -F y ácido carboxílico (COOH).

En un aspecto relacionado, X se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe y -F.

5 En un aspecto relacionado, R' se selecciona entre el grupo que consiste en un -H, -OAc y -P(NiPr₂)(OCH₂CH₂CN).

En un aspecto relacionado, R'' es un trifosfato (-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)₂).

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un compuesto que comprende la estructura seleccionada del grupo que consiste en las Fórmulas II (BndC), III (PEdC), IV (PPdC), V (NapdC), VI (2NapdC), VII (NEdC) y VIII (2NEdC):



15 en donde

X se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH₂CH₂OCH₃, -NH₂ y -azido.

20 En otro aspecto de esta divulgación, el aptámero puede tener una constante de disociación (K_d) para su diana de aproximadamente 10 nM o inferior. En otra realización de ejemplo, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 15 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 20 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 25 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 30 nM o inferior. En aún otra realización a modo de

25

ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 35 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 40 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 45 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana de aproximadamente 50 nM o inferior. En aún otra realización a modo de ejemplo más, el aptámero tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína diana en un intervalo de aproximadamente 3-10 nM (o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nM). Puede determinarse una constante de disociación adecuada con un ensayo de unión usando una titulación multipunto y ajustando la ecuación $y = (\text{máx} - \text{min})(\text{Proteína}) / (K_d + \text{Proteína}) + \text{min}$. Debe entenderse que la determinación de constantes de disociación depende en gran medida de las condiciones que las que se miden y, por lo tanto, estos números pueden variar significativamente con respecto a otros factores tales como tiempo de equilibrio, etc. En otras realizaciones, el aptámero tiene una K_d que es inferior o igual a la K_d de un aptámero seleccionado entre las SEQ ID NO: 1-15.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para detectar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra que comprende: poner en contacto la muestra con un aptámero y realizar un ensayo para detectar el aptámero, en donde la detección del segundo aptámero indica que el microorganismo está presente en la muestra y en donde cuando no se detecta el segundo aptámero indica que el microorganismo está ausente en la muestra; en la que, el aptámero comprende una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en GGCWWCGGGWACCWAWWWAWNGGWWWAGCC(N)_xGWC (SEQ ID NO: 14) and AWCWGGWWC(N)_yWCWGGWWWWAAG (SEQ ID NO: 15), y en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y x es 0, 1, 2, 3, 4 o 5, e y es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30.

En otro aspecto, la pirimidina modificada en el C-5 se selecciona del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (BndC); 5-(N-2-feniletancarboxiamida)-2'-deoxicidina (PEdC); 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PPdC); 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NapdC); 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NapdC); 5-(N-1-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NEdC); 5-(N-2-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NEdC); 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU); 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU); 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU); cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU).

En otro aspecto, el aptámero es amplificable.

En otro aspecto, el ensayo se selecciona entre el grupo que consiste en PCR, qPCR, espectroscopía de masas, secuenciación e hibridación.

En otro aspecto, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, parásito y virus. En un aspecto relacionado, el microorganismo es una célula bacteriana.

En aún otro aspecto relacionado, la célula bacteriana es patógena.

En otro aspecto, la célula bacteriana es una célula de estafilococos.

En otro aspecto, la célula bacteriana es una célula de *Staphylococcus aureus*.

En otro aspecto, el aptámero comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8 y 10-12, en donde W es una pirimidina modificada en el C-5.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende las SEQ ID NO: 1-15.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características particulares y/o realizaciones. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la divulgación a las características particulares o realizaciones descritas.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: Selección e identificación de aptámeros que tienen especificidad de unión a proteínas de *S. aureus*

Este ejemplo proporciona el método representativo para la selección y producción de aptámeros que tienen especificidad de unión a las siguientes diez proteínas de *S. aureus* asociadas a superficie: SpA, CifA, CifB, FnbA, FnbB, SasD, IsdA, IsdB, IsdC e IsdH.

Purificación de dianas de *S. aureus*

65 Porciones relevantes de genes que codifican las dianas deseadas o dominios diana se amplificaron por PCR a partir

de ADN genómico NRS384 (USA300) de *S. aureus* con cebadores y se clonaron en pCR-Script SK+ (Stratgene). Los genes *clf A*, *clfB*, *fnbA*, *sasD*, *isdA*, *IsdB*, *isdC*, y *IsdH* se transfirieron como casetes de *Bam*HI-*Sac*I en el vector de expresión ET-51b (EMD-Novagen) que alberga una etiqueta de Strep aminoterminal y una etiqueta His₁₀ carboxiterminal. Una de las etiquetas, *fnbB*, se clonó y el fragmento *Nde*I-*Bam*HI en pET-14b (EMD-Novagen), que alberga una etiqueta His₁₀ aminoterminal. Se secuenciaron los plásmidos para verificar la identidad génica y la fusión génica adecuada del fragmento de ADN clonado con las secuencias codificadas por vector para la etiqueta His y la etiqueta Strep.

Las proteínas recombinantes se sobreexpresaron en *E. coli* BL21(DE3) o en BL21(DE3)/pLysE (EMD/Novagen). Las condiciones para la expresión óptima de proteínas solubles se optimizaron con respecto a la temperatura de crecimiento (25-37 °C) y el tiempo de inducción 4-15 h). Las células de 0,1-0,8 1 cultivos se sometieron a lisis con 10 ml de reactivo de BugBuster/Benzonase (EMD Millipore). Las proteínas recombinantes, marcadas con His₁₀/Strep se purificaron a partir de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad secuencial sobre agarosa de Ni-NTA y agarosa de Strep-Tactin® Superflow™ (EMD Millipore). Se adquirió proteína A estafilocócica nativa en VWR y se biotinizó con biotina de NHS-PEG4 (Pierce Biotechnology). Las concentraciones de proteína se determinaron usando el Quick Start Bradford Protein Assay Kit (BioRad).

Todas las 10 proteínas de superficie celular de *S. aureus* se encontraron en la fracción soluble cuando se sobreexpresaron en *E. coli*. La cromatografía de afinidad secuencias sobre agarosa de Ni-NTA y Streptactin Sepharose produjo 0,1-1,5 mg de cada proteína al >95 % de pureza (véase Figura 3).

Selección de aptámeros

Se usaron bibliotecas separadas con 5-(N-bencilcarboxiamida)-dU (BndU), 5-(N-naftillmetilcarboxiamida)-dU (NapdU) y 5-(N-triptaminocarboxiamida)-dU (TrpdU) para SELEX con las proteínas de *S. aureus*. Cada selección empezó a partir de secuencias de 1 nmol (10¹⁴-10¹⁵) que contenían 40 posiciones al azar consecutivas flanqueadas por secuencias fijas requeridas para la amplificación de PCR. Se llevó a cabo SELEX esencialmente como se describe (Gold et al., 2010; Vaught et al., 2010; Ochsner y co., 2013). Se usó tampón SB18T por todo SLEX y posteriores ensayos de unión, que consistía en 40 mmol l⁻¹ de HEPES pH 7,5, 0,1 mol l⁻¹ de NaCl, 5 mmol l⁻¹ de KCl, 5 mmol l⁻¹ de MgCl₂ y 0,05 % de Tween-20. Se llevaron a cabo ocho rondas de selección y, empezando con la ronda 2, se llevó a cabo un desafío cinético con 10 mmol l⁻¹ de sulfato de dextrano para favorecer tasas de disociación lentas. El particionamiento de los complejos de aptámero-diana se logró con Talon Dynabeads® paramagnéticas de Talon® (Invitrogen) que se unen a la etiqueta His₁₀ sobre las proteínas recombinantes o con perlas de MyOne Streptavidin C1 (Life Technologies) para la SPA biotinilada. Las secuencias seleccionadas se eluyeron de las dianas unidas a perlas con 80 µl 40 mmol l⁻¹ de NaOH, neutralizaron con 20 µl de 160 mmol l⁻¹ de HCl y se amplificaron por PCR usando polimerasa de ADN de KOD EX (Invitrogen-Life Technologies). Se preparó ADN modificado para la siguiente ronda con polimerasa de ADN de KOD EX mediante extensión de cebador a partir de la cadena antisentido de los productos de PCR y se purificó tal como se describe (Gold et al., 2010).

El análisis cinético de reasociación de ADN (C₀t) de ADN seleccionado a partir de las rondas 3 a 8 se usó para la evaluación de la convergencia de secuencias durante las últimas rondas, indicando una abundancia aumentada de algunas secuencias o familias de secuencias. Las agrupaciones de aptámeros que demostraron una buena afinidad (K_d ≤10 nmol l⁻¹) en radioensayos de unión de solución (véase a continuación) se clonaron y se determinaron las secuencias de 48 clones por agrupación. Se escogieron hasta 12 aptámeros individuales basándose en los patrones de secuencias y su diversidad y se prepararon enzimáticamente para su caracterización adicional.

Se prepararon aptámeros sintéticas como 48-50-méros en una escala de 1 µmol mediante química de fosforamidita estándar y HPLC purificado. Contenían 5'biotin-dA o 5'fluorescein-biotin-dA, y un nucleótido dT invertido en el extremo 3' (3'idT) para estabilidad añadida a las exonucleasas de 3' a 5'.

Se llevaron a cabo ocho rondas de SELEC con estas proteínas, usando tres bibliotecas de ssADN separadas y la cinética de reasociación de Cot indicó una reducción en la complejidad secuencial. Los ensayos de afinidad de agrupación confirmaron la selección exitosa de los aptámeros para un total de 22 agrupaciones obtenidas con los nucleótidos modificados en el C-5 de ssADN de BndU, NapdU o TrpdU, con afinidades de agrupación en el intervalo de 0,13-8,90 nmol l⁻¹. Se observó la unión específica a células de *S. aureus*, pero no la unión a *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, o *P. aeruginosa*.

La alineación de secuencias determinada para 48 clones a partir de cada agrupación mostró clones multicopia y familia que compartían patrones secuenciales comunes. Los clones representativos se cribaron en ensayos de afinidad y los IQ de los aptámeros estuvieron en el intervalo de 0,03-2,17 nmol l⁻¹ (Tabla 1).

Tabla 1. Aptámero para proteínas de superficie celular de *S. aureus*, con afinidad (K_d) mostrada para las secuencias de longitud completa originales obtenidas en SELEX

Diana de proteína	Caracterización de aptámero			Nt. Longitud	n.º de Mod. en el C-5	% de Mod. en el C-5
	Identificador de clon	Mod. en el C-5	K _d (nmol l ⁻¹)			
SPA	4520-8	NapdU	0,22	40	12	30 %
	4531-56	TrpdU	0,03	39	12	30,8 %
ClfA	4503-73	BndU	0,79	40	15	37,5 %
	4522-5	TrpdU	0,35	39	12	30,8 %
ClfB	4504-27	BndU	1,35	40	19	47,5 %
	4511-67	NapdU	3,90	40	16	40 %
	4523-79	TrpdU	0,47	40	13	32,5 %
FnbA	4726-44	NapdU	4,38	40	8	20 %
	4745-51	TrpdU	0,63	40	10	25 %
FnbB	4506-13	BndU	4,73	39	21	52,5 %
	4516-29	NapdU	0,63	40	11	27,5 %
	4527-83	TrpdU	0,84	40	13	32,5 %
IsdA	4727-62	NapdU	0,73	40	11	27,5 %
	4746-3	TrpdU	0,16	40	12	30 %
IsdB	4728-7	NapdU	0,14	40	9	22,5 %
	4747-90	TrpdU	1,98	40	9	22,5 %
IsdC	4507-52	BndU	0,15	40	18	45 %
	4517-71	NapdU	0,08	40	12	30 %
	4528-22	TrpdU	0,07	40	14	35 %
IsdH	4731-69	NapdU	1,30	40	11	27,5 %
SasD	4730-3	NapdU	2,17	40	10	25 %

Los aptámeros de la Tabla 1, en general, tienen de 39 a 40 nucleótidos de longitud y comprenden una pirimidina modificada en el C-5 (por ejemplo, BndU, TrpdU o un NapdU). Además, los aptámeros de la Tabla 1 comprenden desde aproximadamente 8 a aproximadamente 21 pirimidinas modificadas en el C-5 (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19 o 21 pirimidinas modificadas en el C-5) o desde aproximadamente el 20 % de pirimidinas modificadas en el C-5 a aproximadamente el 53 % de pirimidinas modificadas en el C-5 (o desde el 20 %, 22,5 %, 25 %, 27,5 %, 30 %, 30,8 %, 32,5 %, 35 %, 37,5 %, 40 %, 45 %, 47,5 % o el 52,5 %). Los aptámeros de la tabla 1, en general, tienen una K_d de aproximadamente 0,03 nM a aproximadamente 4,7 nM (o 0,03, 0,07, 0,08, 0,14, 0,15, 0,16, 0,22, 0,35, 0,47, 0,63, 0,73, 0,79, 0,84, 1,3, 1,35, 1,98, 2,17, 3,9 y 4,73 nM).

La secuencia de nucleótidos de clon seleccionados que dirigen la proteína de SPA y separadamente la proteína de ClfA se identifican en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Selección de secuencias de nucleótidos de aptámeros de aptámeros identificados mediante SELEX

Diana	Ident. de clon	SEQ ID NO:	Secuencia de nucleótido (5' a 3')
Diana	4520-3	1	CCGGC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCCCA <u>G</u> WCATAA
	4520-8	2	WCGCC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCCCA <u>G</u> WCAGAA
	4520-20	3	GCGGC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCCCA <u>G</u> WCAAAA
	4520-23	4	G <u>W</u> GGC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCCCA <u>G</u> WCAGAA
	4520-27	5	GCGGC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCCCA <u>G</u> WCAGGA
	4520-30	6	G <u>W</u> GA <u>W</u> CGAGCGGC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCCCA <u>G</u> WCAGAA
	4520-42	7	WCGCC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCCCA <u>G</u> WCWGA
	4520-44	8	ACGGC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW <u>W</u> CGGG <u>W</u> WAGCC- <u>A</u> GCAGAA
	Seq. de SPA Motivo	9	GGC <u>W</u> CGGGW <u>A</u> CC <u>W</u> AW <u>W</u> AW- <u>G</u> GW <u>W</u> WAGCC-- <u>G</u> WC
	4503-66	10	A <u>W</u> C <u>W</u> GG <u>W</u> WCAAAG <u>W</u> ACGA <u>W</u> GGGCA <u>W</u> CGG <u>W</u> W <u>W</u> WAAAG <u>W</u>
	4503-68	11	A <u>W</u> C <u>W</u> GG <u>W</u> WCAAAG <u>W</u> AC <u>W</u> GGCGWAA <u>W</u> CGG <u>W</u> W <u>W</u> WAAAGA
	4503-73	12	A <u>W</u> C <u>W</u> GG <u>W</u> WCAAAG <u>W</u> GGCGA <u>W</u> GGGCA <u>W</u> CGG <u>W</u> W <u>W</u> WAAAG <u>W</u>
	Seq. de Clifa Motivo	13	A <u>W</u> C <u>W</u> GG <u>W</u> W- <u>W</u> W <u>W</u> W <u>W</u> WAAAG

* indica que el nucleótido "W" en las secuencias que dirigen la proteína de SPA se encuentran en un nucleótido modificado en el C-5 (específicamente un NapdU)
 + indica que el nucleótido "W" en las secuencias que dirigen la proteína Clifa son un nucleótido modificado en el C-5 (específicamente un BndU)

El motivo (4520) de la secuencia de aptámeros que se une a la proteína SPA se representa por la SEQ ID NO: 9. Este motivo de secuencia puede generalizarse adicionalmente a la siguiente secuencia:
GGCWWCGGGWACCWAWWWAWNGGWWWAGCC(N)_nGWC (SEQ ID NO: 14).

- 5 La "W" en la secuencia representa una posición que puede ser ocupada por una pirimidina modificada en el C-5, y "N" representa una posición que puede ser ocupada por cualquier nucleótido no modificado o modificado, y n es de 0 a 2 (o 0, 1 o 2).

- 10 El motivo (4503) de la secuencia de aptámeros que se une a la proteína ClfA se representa por la SEQ ID NO: 13. Este motivo de secuencia puede generalizarse adicionalmente a la siguiente secuencia:
AWCWGGWWC(N)_nAWCWGGWWWWWAAG (SEQ ID NO: 15)

- 15 La "W" en la secuencia representa una posición que puede ser ocupada por una pirimidina modificada en el C-5, y "N" representa una posición que puede ser ocupada por cualquier nucleótido no modificado o modificado. Además, n puede ser un número de 1 a 30 (o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o), o de 2 a 20 (o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20), o de 5 a 18 (o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18), o de 10 a 16 (o 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16).

20 Ejemplo 2: Unión y captura selectiva de células bacterianas por aptámeros

Este ejemplo muestra que los aptámeros seleccionados e identificados para unirse a proteínas de superficie celular de *S. aureus* también se unen a células completas y son capaces de capturar selectivamente células de *S. aureus* en un cultivo bacteriano mezclado

- 25 Equilibrio de aptámero y ensayos de unión de radiomarcado de célula completa

Se plegaron adecuadamente aptámeros mediante calentamiento durante 5 minutos a 95 °C, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente durante un período de 10-15 min, antes de los ensayos de unión.

- 30 Se determinaron las afinidades (K_a) en ensayos de unión de solución de equilibrio de aptámeros radiomarcados (10-20 pmol l⁻¹) con proteínas diluidas en serie (0,001-100 nmol l⁻¹) y resina Zorbax PSM-300A (Agilent Technologies) para su particionamiento sobre placas de filtrado tal como se describe en (Gold *et al.* 2010).

- 35 Antes del a clonación, también se sometieron a ensayo agrupaciones de aptámeros para la unión específica a *S. aureus*, usando *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Strep. pyogenes*, *Ent. faecalis*, *E. coli* y *Ps. aeruginosa* como controles en 2 h de ensayos de unión de equilibrio. Las densidades celulares variaban de 10⁵-10⁸ UFC ml⁻¹, y 0,1 mmol l⁻¹ de sulfato de dextrano y 0,35 mol l⁻¹ de NaCl se añadieron al tampón de unión para reducir fondo no específico. Además, se cribaron aptámeros individuales para la unión a ocho cepas de *S. aureus* distintas que pertenecen a linajes distintos, incluyendo NRS382, NRS383, NRS384, NRS123, NRS385, NRS386, NRS103 (NARSA) y ATCC 29213 (ATCC).

- 40 Las afinidades de unión de aptámeros a proteínas de *S. aureus* purificados se correlacionaron bien con la unión observada a bacterias completas. Dos de los clones de SpA-NapdU (4520-8 y 4520-9) y tres de clones de SpA-TrpdU (4531-55, 4531-56, 4531-94) fueron capaces de unirse a células completas de cepas de *S. aureus* sometidas a ensayo, con un límite de detección de ~10⁴ células por pocillo (10⁵ - 10⁶ células ml⁻¹) en un ensayo de unión de filtro de radiomarcador. No se observó unión a células de *S. epidermidis* o *S. haemolyticus*, indicando una buena especificidad de estos aptámeros (véase Figura 4B). Se observaron características de unión similares para los aptámeros de ClfA y ClfB. Por el contrario, la mayoría de los aptámeros de FnbA y FnbB que se unieron fuertemente a *S. aureus* también tenían alguna afinidad a *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. Aptámeros dirigidos a proteínas de lsd, en particular lsdC, mostraron una unión fuerte y específica a células de *S. aureus* y se potenciaron las señales cuando las bacterias se habían cultivado en condiciones limitantes de hierro. Los aptámeros de SasD no se unieron a células completas, aunque no queda claro si esto se debe a la más bien modesta afinidad o debido a los bajos niveles de expresión de esta proteína de superficie

55 Captura de células de *S. aureus* con aptámeros dirigidos de superficie celular

- Se prepararon aptámeros biotinilados enzimáticamente mediante extensión de cebador, usando cebadores de PBDC (biotina fotoescindible en el 5', espaciador D y cy3). Para la inmovilización, se añadió 1 pmol de aptámeros PBDC a 20 µl de perlas de MyOne Streptavidin C1 (10 mg ml⁻¹), y se agitó durante 15 min, dando como resultado un ~90 % de eficacia de inmovilización basándose en las mediciones de cy3 en la fracción de sobrenadante no capturado. Las bacterias se cultivaron durante 16 horas a 35 °C in cultivos de caldo de LB o en agar de soja triptica con 5 % de sangre de oveja y 0,1 mmol l⁻¹ de dipiridilo para crear condiciones limitantes de hierro. Las suspensiones celulares que contenían hasta 10⁶ bacterias en 50 µl de SB18T se añadieron a las perlas de captura. Después de la incubación con agitación durante 1 h a 37 °C, las perlas se lavaron y resuspendieron en 50 µl de SB18T. Las células en el sobrenadante no capturado, fracción de lavado y sobre las perlas se enumeraron mediante placas cuantitativas de diluciones en serie sobre agar de LB. La eficacia de captura mediante cultivo cuantitativo también se determinó en poblaciones mezcladas y sobre un intervalo de densidades celulares (10¹-10⁷ UFC ml⁻¹).

El número de moléculas diana por célula es desconocido para cualquiera de estas proteínas de superficie y los niveles de expresión pueden variar dependiendo de las condiciones de crecimiento y fase de crecimiento. Sin embargo, asumiendo que 1.000 copias por células y usando 10^7 UFC ml^{-1} representarían una concentración diana de 20 pmol l^{-1} , que se encuentra en o por debajo de la K_d de aptámero típica. De este modo, los ensayos de unión de filtro de radiomarcador, donde los aptámeros están presentes en bajas concentraciones de $10\text{-}20 \text{ pmol l}^{-1}$, queda limitado a densidades celulares relativamente altas. Para conducir la reacción de unión, se usaron concentraciones superiores (20 nmol l^{-1}) de aptámero biotinilados como agentes de captura unidos a perlas y fueron capaces de detectar tan pocas como 50 células en una muestra de 0,1 ml (Figura 1A). Las concentraciones de aptámeros de 10 nmol l^{-1} o superiores se requirieron para captura eficaz de *S. aureus* a bajas densidades celulares (Figura 1B). Los aptámeros fueron capaces de unirse selectivamente a células de *S. aureus* en cultivos mezclados que contenían *S. aureus*, *S. epidermidis*, y *E. coli* cada uno a 10^5 - 10^6 UFC ml^{-1} . Los mejores agentes de unión en rendimiento fueron SpA 4520-8 and ClfA 4503-73, demostrando una baja unión no específica en comparación con controles de aptámeros modificados de secuencia al azar. La captura de *S. aureus* sobre perlas de aptámeros paramagnéticas fue eficaz en una amplia gama de densidades celulares, desde 5×10^2 a 5×10^9 UFC ml^{-1} (Figura 5).

Ejemplo 3: Detección potenciada de *S. aureus* usando enriquecimiento a base de aptámeros

Este ejemplo proporciona métodos a modo de ejemplo para potenciar la detección de un microorganismo (por ejemplo, *S. aureus*) en una muestra enriqueciendo el microorganismo en la muestra mediante captura a base de aptámeros seguido por un método de detección posterior (por ejemplo, PCR).

La captura de células de *S. aureus* también se logró con 25 nmol l^{-1} de aptámeros sintéticos, biotinilados (50 mers) unidos a perlas de SA paramagnéticas (15 min, 37°C , con agitación intermitente). Las perlas se lavaron dos veces con $100 \mu\text{l}$ de SB 18 para retirar cualquier célula no unida y se resuspendieron en $50 \mu\text{l}$ SB 18. Se añadieron aptámeros de longitud completa, amplificables ($50 \mu\text{l}$ de 20 nmol l^{-1}), y las perlas se incubaron durante 15 min a 37°C con agitación intermitente para permitir el recubrimiento de las células con estos aptámeros específicos de componente de superficie. Después de lavar cinco veces durante 2 min cada $100 \mu\text{l}$ de SB18/1 mmol l^{-1} de sulfato de dextrano/0,01 % de Tween-20 y dos veces con $100 \mu\text{l}$ de SB18, se eluyeron los aptámeros unidos, se depuraron sobre perlas de captura de cebador y se usaron para la qPCR con cebadores específicos para las regiones fijas en el 5' y 3' tal como se ha descrito (Gold *et al.*, 2010).

La captura de células de *S. aureus* mostró ser útil para la detección corriente abajo mediante PCR, bien para el enriquecimiento de la muestra cuando las densidades celulares eran bajas o para retirar inhibidores de la PCR. El recubrimiento de la superficie celular de *S. aureus* con aptámeros de longitud completa, amplificables permitió la detección más rápida mediante qPCR de los aptámeros en comparación con la qPCR de una diana genómica, puesto que cada célula contenía cientos de copias de un componente de superficie diana para la detección, en comparación con un genoma única. En el ejemplo que se muestra en la Figura 2, se capturaron células de *S. aureus* con aptámeros de ClfA no amplificables y se recubrieron con aptámeros de SpA amplificables o controles de aptámeros de secuencia al azar, seguido por qPCR que usa cebadores específicos de aptámeros. Por separado, las células se sometieron a lisis y se sometieron a qPCR usando cebadores genómicos específicos de *S. aureus*, que fue claramente menos eficiente en comparación con qPCR de aptámeros enlazados. Se observó un cambio por hasta ocho ciclos en la detección por qPCR, desde 10 ciclos para qPCR de aptámeros hasta 18 ciclos para qPCR genómica, que es consistente con una relación de varios cientos de copias ($2^8=256$) de aptámeros unidos a superficie a solo un único genoma. El método de captura de aptámero de ClfA y detección de aptámero de SpA fue específico para células de *S. aureus*, puesto que las células de *S. epidermidis* que no poseen ClfA o SpA no dieron como resultado ninguna amplificación de aptámero por encima del fondo. La captura de bacterias sobre perlas seguida por detección con aptámeros no solo permitió el enriquecimiento a partir de suspensiones de baja densidad celular, sino que también permitió la retirada eficaz de inhibidores de PCR. La PCR genómica directa falló cuando las células se encontraban en matrices que contenían exceso de sal (por ejemplo, 1 mol l^{-1} NaCl o $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ de KCl) o bajos niveles de disolventes (por ejemplo, 5 % de isopropanol), a menos que las células se capturaran en primer lugar para retirar estos inhibidores de PCR conocidos (Abu A1-Soud and Radstrom, 1998; Schrader *et al.*, 2012).

Referencias

- Abu Al-Soud, W. and Radstrom, P. (1998) Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* 64, 3748-3753.
- Cao, X., Li, S., Chen, L., Ding, H., Xu, H., Huang, Y., Li, J., Liu, N. *et al.* (2009) Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 37, 4621-4628.
- Dreisbach, A., van Dijk, J.M. and Buist, G. (2011) The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* 11, 3154-3168.
- Dwivedi, H.P., Smiley, R.D. y Jaykus, L.A. (2013) Selection of DNA aptamers for capture and detection of *Salmonella typhimurium* using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3677-3686.
- Falugi, F., Kim, H.K., Missiakas, D.M. and Schneewind, O. (2013) Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *MBio* 4, e00575-00513.

- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F. *et al.* (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187, 2426-2438.
- 5 Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E.N., Carter, J., Dalby, A.B. *et al.* (2010) Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One* 5, e15004.
- Gold, L., Walker, J.J., Wilcox, S.K. and Williams, S. (2012) Advances in human proteomics at high scale with the SOMAscan proteomics platform. *N Biotechnol* 29, 543-549.
- 10 Grigg, J.C., Ukpabi, G., Gaudin, C.F. y Murphy, M.E. (2010) Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J Inorg Biochem* 104, 341-348.
- Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G. y Herrmann, M. (2001) Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol* 183, 6778-6786.
- 15 Kobayashi, S.D., y Deleo, F.R. (2013) *Staphylococcus aureus* Protein A Promotes Immune Suppression. *MBio* 4, e00764-13. doi: 10.1128
- Marraffini, L.A., Dedent, A.C. y Schneewind, O. (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 192-221. Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M. and Schneewind, O. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299, 906-909.
- 20 McCarthy, A.J. y Lindsay, J.A. (2010) Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* 10, 173.
- McDevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., Foster, T. y Hook, M. (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247, 416-424.
- 25 Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M. y Foster, T.J. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30, 245-257.
- Ochsner, U.A., Katilius, E. y Janjic, N. (2013) Detection of *Clostridium difficile* toxins A, B and binary toxin with slow off-rate modified aptamers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76, 278-285.
- 30 Palma, M., Wade, D., Flock, M. y Flock, J.I. (1998) Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen. *J Biol Chem* 273, 13177-13181.
- Rao, S.S., Mohan, K.V., Gao, Y. y Atreya, C.D. (2013) Identification and evaluation of a novel peptide binding to the cell surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* 168, 106-112.
- 35 Roche, F.M., Massey, R., Peacock, S.J., Day, N.P., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M. y Foster, T.J. (2003) Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* 149, 643-654. Roche, F.M., Downer, R., Keane, F., Speziale, P., Park, P.W. y Foster, T.J. (2004) The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem* 279, 38433-38440.
- 40 Schneewind, O., Fowler, A. y Faull, K.F. (1995) Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* 268, 103-106.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. y Johnne, R. (2012) PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 113, 1014-1026.
- 45 Sorum, M., Sangvik, M., Stegger, M., Olsen, R.S., Johannessen, M., Skov, R. y Sollid, J.U. (2013) *Staphylococcus aureus* mutants lacking cell wall-bound protein A found in isolates from bacteraemia, MRSA infection and a healthy nasal carrier. *Pathog Dis* 67, 19-24. Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza, G., Di Poto, A., Visai, L. y Arciola, C.R. (2009) Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol* 4, 1337-1352.
- Stranger-Jones, Y.K., Bae, T. y Schneewind, O. (2006) Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 16942-16947.
- 50 Timofeyeva, Y., Scully, I.L. y Anderson, A.S. (2014) Immunofluorescence microscopy for the detection of surface antigens in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Methods Mol Biol* 1085, 85-95.
- Vaught, J.D., Bock, C., Carter, J., Fitzwater, T., Otis, M., Schneider, D., Rolando, J., Waugh, S. *et al.* (2010) Expanding the chemistry of DNA for *in vitro* selection. *J Am Chem Soc* 132, 4141-4151.
- 55 Ythier, M., Resch, G., Waridel, P., Panchaud, A., Gfeller, A., Majcherczyk, P., Quadroni, M., y Moreillon, P. (2012) Proteomic and transcriptomic profiling of *Staphylococcus aureus* surface LPXTG-proteins: correlation with *agr* genotypes and adherence phenotypes. *Mol Cell Proteomics* 11, 1123-1139.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> SOMALOGIC, INC.
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS
- <130> 0057.68PCT
- 65 <150> 61/947.627

<151> 04-03-2014
 <150> 61/940.955
 <151> 18-02-2014
 5 <160> 15
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (6)..(7)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (12)..(12)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (16)..(16)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (18)..(19)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (21)..(21)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (25)..(27)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (35)..(35)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <400> 1
 55 ccggcnnccgg gnaccnanna ncggnnnagc ccagncataa 40
 <210> 2
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (1)..(1)

<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (6)..(7)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (12)..(12)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (16)..(16)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (18)..(19)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (21)..(21)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (25)..(27)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (35)..(35)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <400> 2
 40 ncggnncgg gnaccnanna ncggnnagc ccagncagaa 40
 <210> 3
 <211> 40
 < 212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)

<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (21)..(21)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (25)..(27)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (35)..(35)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <400> 3
 20 gcggcnncgg gnaccnanna ncggnnagc ccagncaaaa 40
 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)

<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 <400> 4
 gnggcnnccgg gnaccnanna nccggnnagc ccagncagaa 40
 5
 <210> 5
 <211> 40
 < 212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 50
 <400> 5
 gcggcnccgg gnaccnanna nccggnnagc ccngncagga 40
 55
 <210> 6
 <211> 48
 < 212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(30)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(35)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 45

<400> 6
 gngancgagc ggcncgggn accnannann ggnnagccc agncagaa 48

<210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 35

<400> 7
 ncggnncgg gnaccnanna ncggnnagc ccagncngaa 40

<210> 8
 <211> 39
 < 212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40

<220>
 <223> Sintético
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina
 65

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (21)..(21)	
5	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (25)..(27)	
10	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (34)..(34)	
15	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<400> 8	
	acggcnnccgg gnaccnanna nccggnnagc cagncagaa	39
	<210> 9	
20	<211> 31	
	< 212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4)..(5)	
30	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(10)	
35	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
40	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(17)	
45	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (19)..(19)	
50	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (22)..(24)	
55	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (30)..(30)	
60	<223> 5-[N-(1-naftilmetil)carboxiamida]-2'-deoxiuridina	
	<400> 9	
	ggcnnccgggn accnannang gnnnagccgn c	31
65	<210> 10	
	<211> 40	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 10 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 15 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 20 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 25 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 30 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 35 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 40 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(36)
 45 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 50 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

 <400> 10
 ancnggnca aagngacgan ngggcancng gnnnnaagn 40

 55 <210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 65 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 45

<400> 11
 ancnggnncn aagnnacng gcgnaancng gnnnnnaaga 40

<210> 12
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(36)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 35

<400> 12
 ancnggncca aagnggcgan ngggcancng gnnnnnaagn 40

<210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
 65

- 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(20)
 <223> 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina
- 15
 <400> 13
 ancnggnca ncnngnnnnn aag 23
- 20
 <210> 14
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 25
 <220>
 <223> Sintético
- 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> pirimidina modificada en el C-5
- 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> pirimidina modificada en el C-5
- 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> pirimidina modificada en el C-5
- 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> pirimidina modificada en el C-5
- 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> pirimidina modificada en el C-5
- 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> nucleótido no modificado o modificado
- 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(25)
 <223> pirimidina modificada en el C-5
- 65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(31)
 <223> nucleótido no modificado o modificado, y puede estar ausente
- 70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> pirimidina modificada en el C-5

	<400> 14 ggcnnccgggn accnannann ggnnnagccn ngnc	34
5	<210> 15 <211> 53 < 212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
15	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(2) <223> pirimidina modificada en el C-5	
20	<220> <221> misc_feature <222> (4)..(4) <223> pirimidina modificada en el C-5	
25	<220> <221> misc_feature <222> (7)..(8) <223> pirimidina modificada en el C-5	
30	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(39) <223> nucleótido no modificado o modificado y puede estar ausente	
35	<220> <221> misc_feature <222> (41)..(41) <223> pirimidina modificada en el C-5	
40	<220> <221> misc_feature <222> (43)..(43) <223> pirimidina modificada en el C-5	
45	<220> <221> misc_feature <222> (46)..(50) <223> pirimidina modificada en el C-5	
	<400> 15 ancnggnncn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnna ncnggnnnnn aag	53

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de GGCWWCGGGWACCWAWWWAWNGGWWWAGCC(N)_nGWC (SEQ ID NO: 14), en donde W es independientemente, por cada aparición, una pirimidina modificada en el C-5, N es cualquier nucleótido no modificado o modificado y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5, en donde la pirimidina modificada en el C-5 se selecciona del grupo que consiste en 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (BndC); 5-(N-2-feniletilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PEdC); 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (PPdC); 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NapdC); 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NapdC); 5-(N-1-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (NEdC); 5-(N-2-naftil-2-etilcarboxiamida)-2'-deoxicidina (2NEdC); 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (BndU); 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (iBudU); 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-deoxiuridina (TrpdU); cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propil]carboxiamida)-2'-deoxiuridina y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-deoxiuridina (NapdU) y en donde el ácido nucleico es capaz de unirse a una proteína de superficie celular de un microorganismo.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, un parásito y un virus, en donde opcionalmente la célula bacteriana es patógena, una célula de *Staphylococcus* o una célula de *Staphylococcus aureus*.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la proteína de superficie celular es una proteína de superficie celular bacteriana, en donde opcionalmente la proteína de superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en proteína A estafilocócica (SPA), factores de aglutinación (ClfA, ClfB), proteínas de unión a fibronectina (FnbA, FnbB), determinantes de superficie regulados por hierro (IsdA, IsdB, IsdC, IsdH) y una proteína de adhesión putativa (SasD).
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:1-8.
5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en donde la molécula de ácido nucleico es capaz de unirse a la proteína de superficie celular con una constante de unión de equilibrio (K_d) de aproximadamente 0,03 nM a aproximadamente 4,7 nM.
6. Un kit para detectar la presencia o la ausencia de un microorganismo en una muestra que comprende una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

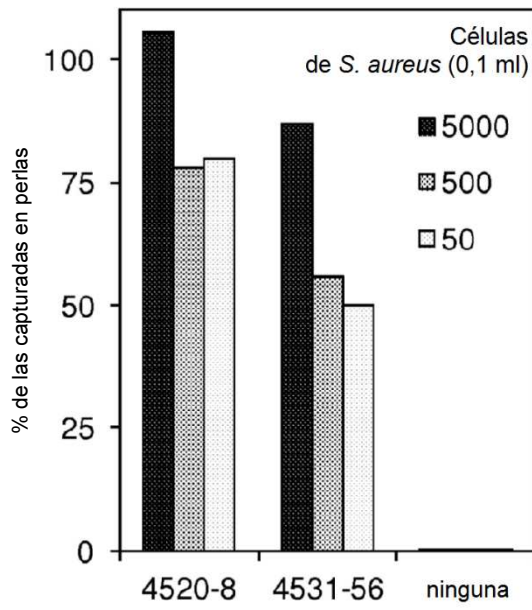


FIG. 1A

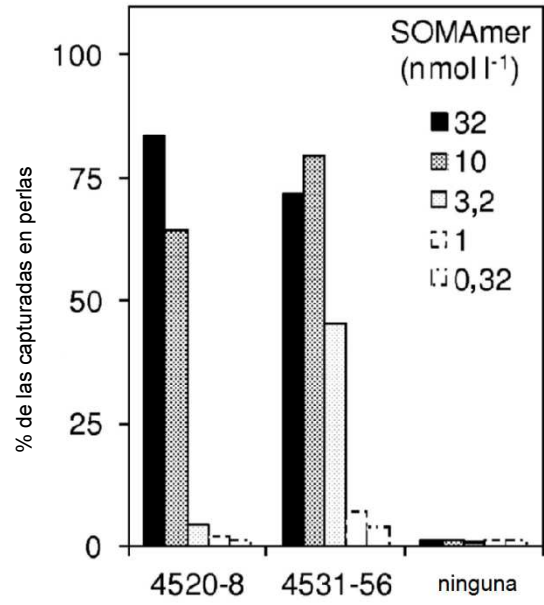


FIG. 1B

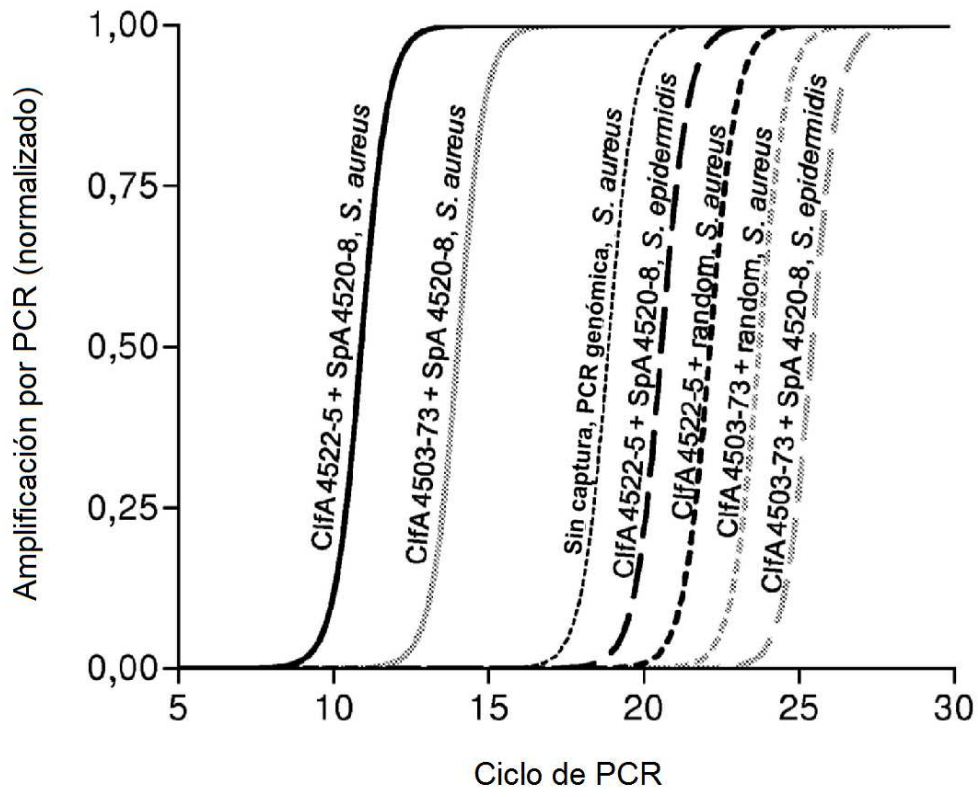


FIG. 2

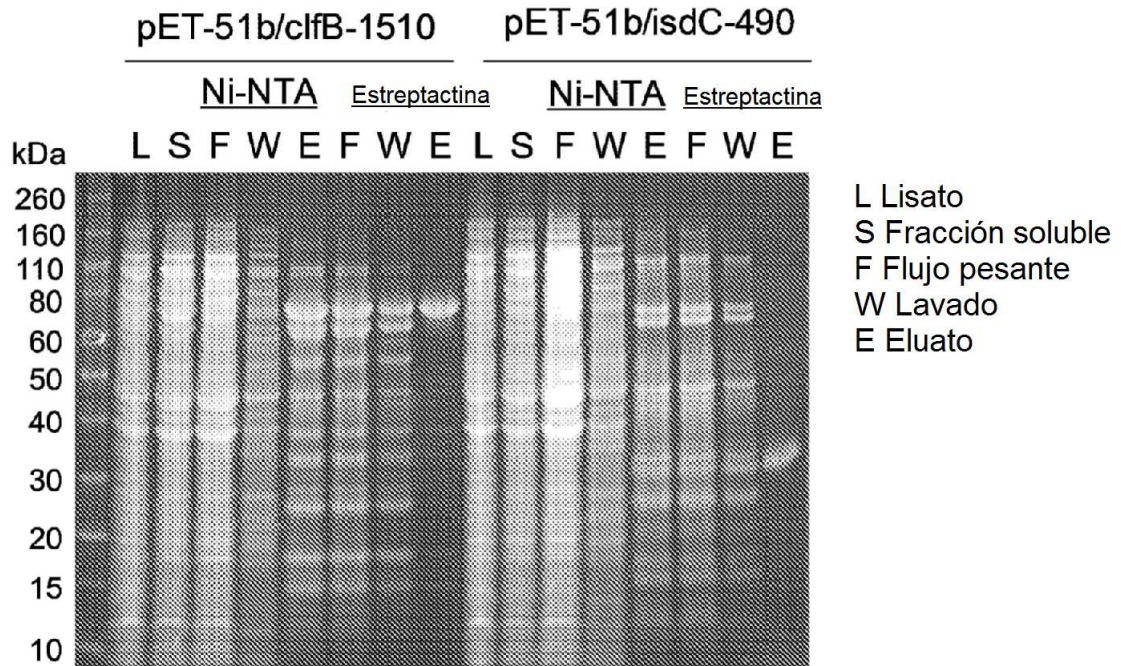


FIG. 3

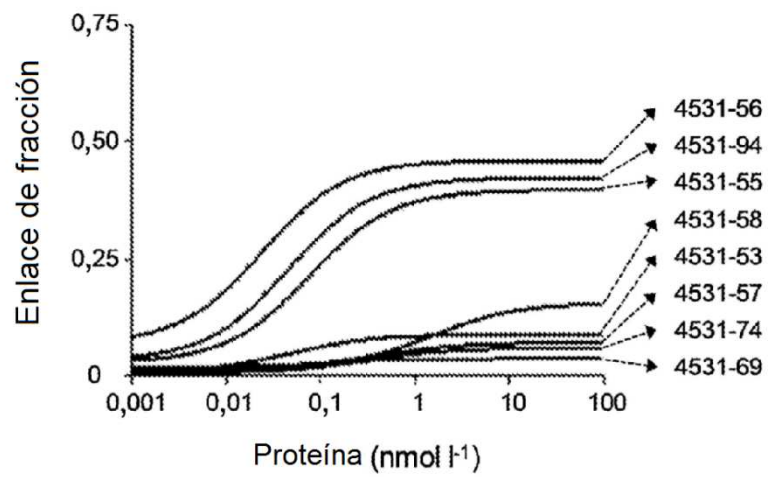
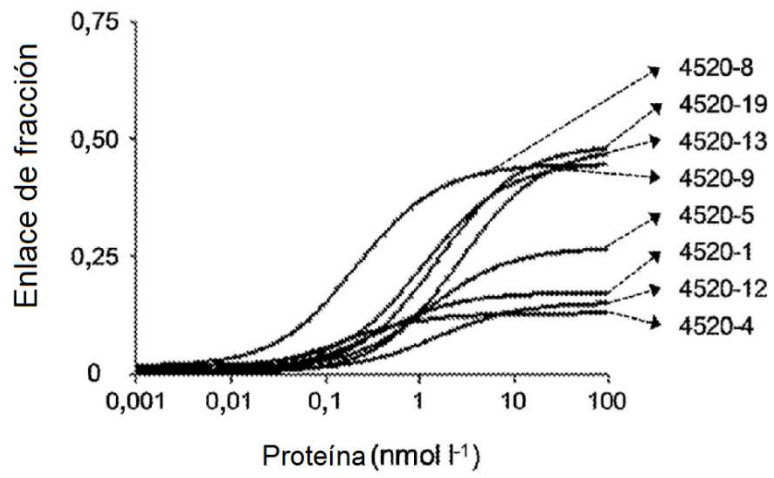


FIG. 4A

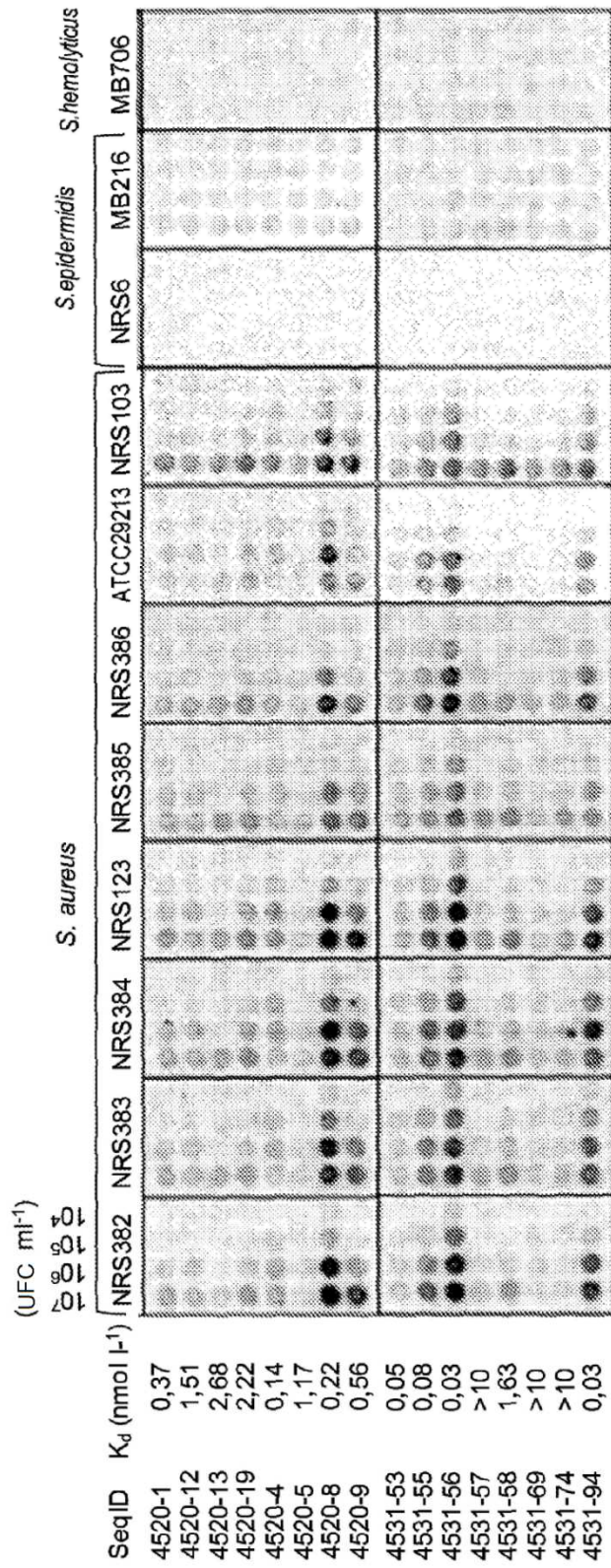


FIG. 4B

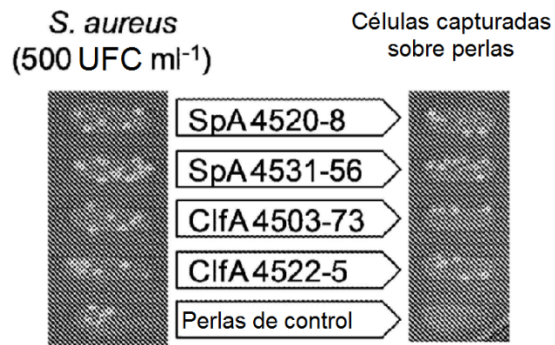


FIG. 5A

<i>S. aureus</i> 5x10 ⁹ UFC ml ⁻¹		<i>S. epidermidis</i> 5x10 ⁹ UFC ml ⁻¹	
Perlas de SpA 4520-8	Control sin perlas	Perlas SpA 4520-8	Control sin perlas

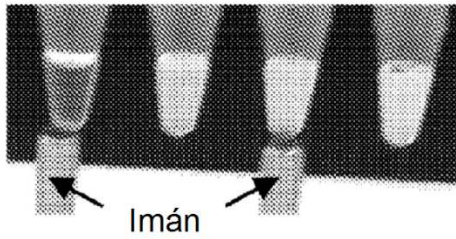


FIG. 5B