

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 474**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2008.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/EP2015/000393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15706159 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3108007**

54 Título: **Un método para detectar un microorganismo en una muestra mediante un método de detección basado en fluorescencia usando SOMAmers**

30 Prioridad:

21.02.2014 EP 14290046

21.02.2014 EP 14290047

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

02.01.2020

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (50.0%)

Frankfurter Strasse 250

64293 Darmstadt, DE y

SOMALOGIC, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

BAUMSTUMMLER, ANNE;

MARC-KREUCHER, FRÉDÉRIC;

LEHMANN, DAVID;

OCHSNER, URS y

JANJIC, NEBOJSA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 736 474 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

Un método para detectar un microorganismo en una muestra mediante un método de detección basado en fluorescencia usando SOMAmers.

5 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a un método para detectar *Staphylococcus aureus*, en una muestra, que comprende las etapas de a) incubar la muestra con un aptámero modificado de constante de disociación lenta (SOMAmer) que comprende una etiqueta fluorescente, b) de manera opcional, lavar la muestra, c) analizar la muestra mediante un método de detección basado en fluorescencia.

10 La invención se refiere además a un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente, en la que el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos específica para *Staphylococcus aureus*, su uso para detectar células de *Staphylococcus aureus* en una muestra, y a un microarreglo o biosensor y a un kit que comprende al menos uno de tales SOMAmers que comprenden una etiqueta fluorescente.

15 El monitoreo de contaminación microbiana de alimentos, agua, productos no estériles, o el ambiente se basa normalmente en métodos microbiológicos tradicionales, tales como métodos de cultivo. Para la detección de un microorganismo en particular, se pueden usar medios de cultivo selectivos o diferenciales que permiten respectivamente el crecimiento solo de microorganismos seleccionados o la diferenciación de un tipo de microorganismo a partir de otro que crece en los mismos medios. Estos métodos requieren varios días para dar un resultado debido a que dependen de la capacidad de microorganismos de crecer para originar colonias visibles. Incluso si son prolongados, continúan siendo los métodos de detección estándares.

25 En las últimas dos décadas, muchas tecnologías y sistemas de detección han surgido en el campo de microbiología rápida, tales como tecnologías basadas en amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) e inmunoensayos. Estas tecnologías alternativas reducen el tiempo de detección en comparación con los métodos basados en cultivos tradicionales.

30 Se conoce que la NAAT da resultado de contaminación en unas pocas horas. Sin embargo, esta tecnología tiene varias desventajas, tales como la complejidad de los protocolos que requieren altas capacidades técnicas o cuestiones de falso positivo y se encuentran todavía limitadas por el método de preparación de muestra.

35 Los inmunoensayos dependen del uso de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos tanto para capturar y/o detectar el microorganismo diana. La eficiencia y el éxito de un inmunoensayo dependen de la calidad de los anticuerpos que se usan en el ensayo. Debido a la manera en que se producen (en animales o mediante cultivo celular), una desventaja de usar anticuerpos consiste en la cuestión con la reproducibilidad de lote a lote.

Para superar ciertas desventajas de anticuerpos y mejorar la calidad del ensayo, se han desarrollado nuevos aglutinantes de afinidad, tales como aptámeros.

40 Los aptámeros son sintéticos, de cadenas de ADN o ARN cortas que puede plegarse en una diversidad de estructuras y pueden unirse de manera específica, como un anticuerpo a su diana.

45 Los aptámeros de ADN ya se han usado para la detección de microorganismos (incluyendo *S. aureus*). Además, los aptámeros de ADN etiquetados con fluorescencia se han informado también para la detección de células bacterianas enteras usando métodos de fluorescencia:

US 2012/0071639 A1 divulga secuencias de ADN específicas para unión de diversos patógenos alimentarios y transmitidos por el agua y biotoxinas.

50 WO 2013/064818 A1 divulga aptámeros etiquetados con fluorescencia para la detección de bacterias patógenas en una muestra.

55 Cao et al. (2009, Nucleic Acids Res 37, 4621-4628) divulga un panel de aptámeros de ADNmc específicos para *Staphylococcus aureus* que se obtienen mediante un procedimiento SELEX de bacterias enteras. La combinación de cinco de estos aptámeros da como resultado un buen efecto en el reconocimiento de diferentes cepas de *S. aureus*.

Dwivedi et al. (2013, Appl Microbiol Biotechnol 97, 3677-3686) describe aptámeros de ADN específicos para *Salmonella enterica* serova Typhimurium y su uso para la detección de *Salmonella* mediante citometría de flujo.

60 Gold et al. (2010, PLoS One 5, e15004) y Vaught et al. (2010, J Am Chem Soc 132, 4141-4151) describen el desarrollo de un nuevo reactivo basado en aptámero denominado SOMAmer (aptámero modificado de constante de disociación lenta). Los SOMAmers se constituyen a partir de ADN monocatenario (ADNmc) que contiene residuos de pirimidina modificados en su posición 5-prima con análogos de cadenas laterales de aminoácidos y que tienen tasas de disociación bastante altas (>30 min). Estas características conducen a mejor afinidad y mejores propiedades cinéticas de los SOMAmers en comparación con aptámeros de ADN o ARN estándares.

65

US 7947447 B2 divulga métodos SELEX mejorados para producir SOMAmers que resultan capaces de unirse a moléculas diana con constantes de disociación más lentas que se obtienen usando métodos SELEX anteriores.

5 Ochsner et al. (2013, Diagn Microbiol Infect Dis. 76, 278-285) describe la caracterización de SOMAmers específicos para toxinas de *Clostridium difficile*, a saber, proteínas microbianas.

10 CAMILLE LA HAMULA ET AL, TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 30, no. 10, 2011, páginas 1587-1597, se refiere a la selección y aplicaciones analíticas de patógenos microbianos de unión a aptámeros.

El uso de SOMAmers para la detección de células bacterianas enteras no se ha descrito en el estado de la técnica.

15 El objeto de la presente invención consistió en la provisión de reactivos adecuados para la detección de microorganismos en muestras complejas.

De manera sorprendente, se descubrió que SOMAmers altamente específicos etiquetados con fluorescencia constituyen una herramienta muy efectiva para la detección de microorganismos en muestras complejas mediante métodos basados en fluorescencia.

20 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un método para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra, que comprende las etapas de

25 a) incubar la muestra con un aptámero modificado de constante de disociación lenta (SOMAmer) que comprende una etiqueta fluorescente,

b) de manera opcional, lavar la muestra,

30 c) analizar la muestra mediante un método de detección basado en fluorescencia, según se define en la reivindicación 1.

35 Los SOMAmers (aptámeros modificados de constante de disociación lenta) se constituyen a partir de ADN monocatenario (ADNmc) que contiene residuos de pirimidina modificados en su posición 5-prima con análogos de cadenas laterales de aminoácidos y que tienen constantes de disociación bastante altas (>30 min). Estas características conducen a mejor afinidad y mejores propiedades cinéticas de los SOMAmers en comparación con aptámeros de ADN o ARN estándares (Gold et al., 2010, PLoS One 5, e15004; Vaught et al., 2010, J Am Chem Soc 132, 4141-4151).

40 Según se usa en la presente, "constante de disociación lenta" se refiere al tiempo que transcurre para que un complejo aptámero/diana comience a disociarse. Esto puede expresarse como una vida media o el punto en el que el 50% del complejo aptámero/diana se ha disociado. La constante de disociación o constante de disociación de un SOMAmer, que se expresa como valores de vida media ($t_{1/2}$), puede ser de más de 30 min, más de 60 min, más de 90 min o más de 120 min. El tiempo de disociación puede medirse mediante sistemas dinámicos que monitorean la asociación y disociación de complejos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, Resonancia de Plasmón de Superficie.

45 Los reactivos de SOMAmers pueden generarse con respecto a proteínas asociadas a superficie celular de microorganismos mediante métodos SELEX con múltiples bibliotecas génómicas de ADN modificado usando proteínas recombinantes nativas o purificadas. Los métodos SELEX adecuados para generar tales SOMAmers se divulgan en US 7947447 B2.

50 Los métodos químicos, microbiológicos y biológicos moleculares convencionales necesarios para poner en práctica la invención se conocen por una persona experta en la técnica y pueden encontrarse además en la literatura estándar.

55 En la descripción, el término microorganismo se refiera a bacteria, levadura u hongo. El microorganismo puede ser una bacteria, por ejemplo, una bacteria patógena. Puede seleccionarse, por ejemplo, a partir del grupo que consiste de *Salmonella spp.* (tales como *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*), *Escherichia coli*, *Listeria spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Legionella*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Vibrio*.

60 De acuerdo con la presente invención, el microorganismo es *Staphylococcus aureus*.

65 Ejemplos de proteínas asociadas a superficie de *Staphylococcus aureus*, respecto a las cuales se puede preparar por ejemplo, SOMAmers, incluyen SpA, ClfA, ClfB, FnbA, FnbB, SasD, IsdA, IsdB, IsdC, e IsdH. Todas estas proteínas se fijan a la pared celular mediante corte mediado con sortasa entre la treonina y la glicina del motivo de sortasa LXPTG y se unen por enlace amídico al puente de pentaglicina de peptidoglicano (Marraffini et al., 2006, Microbiol Mol Biol Rev 70: 192-221). La proteína A de *S. aureus* (SpA) se presenta en la superficie bacteriana así como también se secreta en el medio extracelular. ClfA y ClfB son proteínas de unión a fibrinógeno que se relacionan estructuralmente

(McDevitt et al., 1997, Eur J Biochem 247:416-424; Ni Eidhin et al., 1998, Mol Microbiol 30: 245-257). ClfB es uno de los factores clave responsables de la adhesión a células epiteliales descamativas de las fosas nasales anteriores, y se produce normalmente durante fase exponencial temprana de crecimiento (Ni Eidhin et al., 1998, véase lo anterior). FnbA y FnbB se adhieren a componentes de la matriz extracelular, tanto fibronectina como elastina, y resultan importantes para colonización de tejidos huésped durante infección (Roche et al., 2004, J Biol Chem 279:38433-38440) SasD es una proteína de adhesión putativa con papel fisiológico desconocido (Roche et al., 2003, Microbiology 149: 643-654; Ythier et al., 2012, Mol Cell Proteomics 11: 1123-1139). Cuatro de las proteínas corresponden al sistema determinante de superficie de respuesta a hierro (Isd) que se induce en *S. Aureus* en condiciones limitantes de hierro y que resulta importante para captura de hemo a partir de hemoglobina (IsdB, IsdH) y su transporte (IsdA, IsdC) a través de la pared celular (Grigg et al., 2010, J Inorg Biochem 104: 341-348; Mazmanian et al., 2003, Science 299: 906-909).

Normalmente, la muestra para analizar es una muestra compleja, tal como una muestra clínica, un alimento o muestra de alimentación, una muestra de bebida, una muestra farmacéutica (incluyendo agua para inyección), una muestra de cuidado personal y/o cosmético. La muestra puede ser un ingrediente bruto, un producto acabado o puede tomarse a partir del ambiente de fabricación o almacenamiento. Preferiblemente, la muestra es una muestra clínica, una muestra de alimento, una muestra farmacéutica y/o un producto de cuidado personal.

“Muestra compleja” se refiere a una muestra que comprende más de un componente. Por ejemplo cuando se trata de un alimento o alimentación – puede ser carne o un producto de carne (por ejemplo, producto de carne cocida o cruda), un producto lácteo o una composición que se usa en la producción de un producto lácteo, tal como queso o yogurt, un producto alimenticio basado en vegetales, un alimento listo para consumir o un ingrediente alimentario, un producto salado, una fórmula infantil. En una realización, la muestra puede ser un producto de cuidado personal o cosmético tal como un producto para el tratamiento ocular, tal como solución para lentes de contacto. Si la muestra es una bebida, puede ser, por ejemplo, una cerveza o una muestra que se toma durante la elaboración de cerveza, agua potable. Las muestras farmacéuticas incluyen fármacos para humanos así como también para animales (a saber, para aplicaciones veterinarias). Una muestra clínica puede ser, por ejemplo, un fluido corporal, en particular, sangre, plasma o suero o una muestra de tejido.

Muestras de ejemplo incluyen, pero sin limitación, alimento (por ejemplo, leche de vacas, ovejas, cabras, yeguas, burros, camellos, yak, búfalo acuático y reno, productos lácteos, carne de res, cabra, cordero, ovino, cerdo, patas de rana, ternera, roedor, caballo, canguro, aves de corral, incluyendo pollo, pavo, pato, ganso, paloma o tórtola, avestruz, emú, alimentos marinos, incluyendo pez de aleta, tal como salmón y tilapia, y mariscos tales como moluscos y crustáceos y caracoles, productos de carne, productos vegetales, semillas, cereales a partir de gramíneas, incluyendo maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo, y mijo, cereales a partir de no gramíneas, incluyendo trigo sarraceno, amaranto, y quinoa, legumbres, incluyendo frijoles, cacahuates, guisantes, y lentejas, frutos secos, incluyendo almendras, nueces, y nueces de araucaria, semillas oleaginosas, incluyendo girasol, colza y sésamo, verduras como verduras de raíz, incluyendo papas, mandioca y nabos, verduras de hoja, incluyendo amaranto, espinaca y col rizada, vegetales marinos, incluyendo dulce, kombu, y daberlocks, verduras de tallo, incluyendo brotes de bambú, nopales, y espárragos, verduras de inflorescencia, incluyendo alcachofas, brócoli, y lirios, y verduras de fruto, incluyendo calabaza, quimbombó y berenjena, frutas, hierbas y especias, sangre entera, orina, esputo, saliva, líquido amniótico, plasma, suero, lavado pulmonar y tejidos, incluyendo, pero sin limitación, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas y similares. El artesano experto apreciará que lisados, extractos o material (homogenizado) que se obtiene a partir de cualquiera de las muestras de ejemplo anteriores o mezclas de dichas muestras de ejemplo o composiciones que comprenden una o más de dichas muestras de ejemplo constituyen también muestras dentro del alcance de la invención.

De acuerdo con la presente invención, el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos específica para *Staphylococcus aureus*.

El término “secuencia de nucleótidos” según se usa en la presente se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos, y variante, homólogos, fragmentos y derivados de estos (tales como porciones de estos). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen sintético o recombinante, y puede ser monocatenaria si representa la cadena con sentido o antisentido.

El término “secuencia de nucleótidos” con respecto a la presente invención incluye ADN y ARN sintéticos. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos del SOMAmer de acuerdo con la presente invención puede sintetizarse, en su totalidad o en parte, usando métodos químicos que se conocen bien en la técnica.

El término “específico” según se usa en la presente se refiere a que el SOMAmer reacciona selectivamente con células de *Staphylococcus aureus* en comparación con otros microorganismos.

Los SOMAmers de acuerdo con la presente invención pueden usarse de una manera análoga a anticuerpos. Como anticuerpos, los SOMAmers proporcionan especificidad de unión a diana.

En un aspecto, el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16 o un fragmento de estas o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas.

5 Preferiblemente, el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12 o un fragmento de estas o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas.

10 Más preferiblemente, el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12.

15 En un aspecto muy preferido, el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.

20 El término "fragmento" según se usa en la presente se refiere a una porción de la secuencia de aptámero que se enseña en la presente que tiene la misma o mejor afinidad, especificidad o actividad funcional para la diana de interés en comparación con la secuencia completa. El fragmento puede comprender alrededor de 35 nucleótidos (por ejemplo, 33-37 nucleótidos). El fragmento tiene preferiblemente una estructura secundaria similar con aquella del aptámero de longitud completa original en la región que se representa mediante el fragmento.

25 La presente invención comprende además el uso de secuencias que tienen al menos el 80% de identidad de secuencia con la secuencia(s) de ácido nucleico de la presente invención. En el presente contexto, una secuencia similar se considera que incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser idéntica en al menos el 80%, preferiblemente, idéntica en al menos el 90%, más preferiblemente, idéntica en al menos el 95% o 98% con respecto a la secuencia sujeto. Normalmente, las secuencias similares comprenderán la misma estructura secundaria o similar con respecto al SOMAmer objeto.

30 En una realización, una secuencia similar se considera que incluye una secuencia de nucleótidos que tiene una o varias adiciones, supresiones y/o sustituciones en comparación con la secuencia objeto. Las comparaciones de identidad de secuencia pueden realizarse a ojo, o de manera más usual, con la asistencia de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de ordenador disponibles comercialmente pueden calcular el % de identidad entre dos o más secuencias.

35 La enseñanza incluye además secuencias que son complementarias con respecto a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención o secuencias que resultan capaces de hibridarse ya sea con secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias a estas. El término "hibridación" según se usa en la presente deberá incluir "el proceso por medio del cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de apareamiento de bases". La hibridación ocurre en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50 °C y 0,2xSSC{1xSSC = NaCl 0,15 M, citratoNa₃ 0,015 M pH 7,0}).

45 De acuerdo con la presente invención, los SOMAmers comprenden una etiqueta fluorescente. La etiqueta puede fijarse en tanto el extremo 5' o 3' del SOMAmer. En una realización preferida, la etiqueta se fija en el extremo 5' del SOMAmer. La persona experta conoce bien las técnicas para fijar etiquetas fluorescentes a cadenas de ácidos nucleicos. Uno cualquiera de estos métodos puede utilizarse en la presente invención para fijar una etiqueta fluorescente en los SOMAmers, por ejemplo, según se describe por Schubert et al, 1990, Nucleic Acids Research 18, 3427. En principio, la etiqueta fluorescente puede fijarse durante o después de la síntesis de oligonucleótidos.

50 La etiqueta fluorescente puede fijarse directamente o indirectamente en el SOMAmer. Para fijación indirecta, puede usarse cualquier mecanismo que se conoce por la persona experta en la técnica, tal como el uso de biotina o estreptavidina o Digoxigenina (DIG) y Antidigoxigenina.

55 La etiqueta fluorescente adecuada se selecciona por la persona experta en la técnica dependiendo de diferentes parámetros, tal como el tamaño de la etiqueta y/o las propiedades ópticas, tal como el color, las longitudes de onda de excitación de fluorescencia, las longitudes de onda de emisión de fluorescencia e intensidad. Una gran variedad de etiquetas fluorescentes se disponen comercialmente. Ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas son colorantes de fluoresceína (tales como fluoresceína, 6-FAM (6-carboxifluoresceína), JOE, TET, HEX), colorantes de rodamina (tales como 5'-Tamra, ROX, TRITC, X-Rodamina, Lisamina Rodamina B), colorantes de cianina (tales como Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, IRD700, IRD800, Aloficocianina (APC)), Peridinina-clorofila (PerCP), R-ficoeritrina (R-PE), colorantes de cumarina (tales como hidroxicumarina, aminocumarina, metoxicumarina) y puntos cuánticos. Ejemplos adicionales son Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 405, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 500, Alexa Fluor® 514, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 610, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750, Alexa Fluor® 790, DyLight 350, DyLight 408, DyLight 488, DyLight 549, DyLight 594, DyLight 633,

DyLight 649, DyLight 680, DyLight 759, DyLight 800, eFluor® 660, Cascade Blue, Pacific Blue, Pacific Orange, Lucifer Yellow, NBD, Red 613, TruRed, FluorX, BODIPY-FL, Texas Red. Preferiblemente, se usa fluoresceína.

5 El método de acuerdo con la presente invención incluye en etapa a) la incubación de la muestra con un aptámero modificado de constante de disociación lenta (SOMAmer) que comprende una etiqueta fluorescente. Esto significa que los SOMAmers que comprenden una etiqueta fluorescente se mezclan con la muestra y se incuban durante un período de tiempo.

10 Normalmente, la muestra se inocula directamente en un regulador o un medio de crecimiento (incubación opcional) antes de análisis adicional mediante el método de detección basado en fluorescencia usando los SOMAmers. Si la muestra es una muestra sólida, puede resultar necesaria la realización de homogeneización después o durante la adición del regulador o medio de crecimiento. En una realización adicional alternativa, la muestra sólida se enguaja con un fluido que se recolecta luego para incubación adicional opcional en un medio de crecimiento y análisis adicional
15 con los SOMAmers.

De manera alternativa, los SOMAmers se mezclan con un regulador adecuado o con un medio de crecimiento que luego se mezcla con la muestra. Si la muestra es una muestra sólida, puede resultar necesario realizar homogeneización después o durante la adición del regulador/ medio de crecimiento que comprende los SOMAmers.

20 Un regulador adecuado puede seleccionarse por una persona experta en la técnica. Normalmente tiene un valor de pH mayor que 5 y menor que 9, preferiblemente mayor que 6 y menor que 8, más preferiblemente, entre 6,5 y 7,5. El regulador que puede usarse en el método de la presente invención se selecciona preferiblemente a partir del grupo de regulador de fosfato, regulador salino regulado con fosfato (PBS), regulador de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol (TRIS), regulador salino regulado con TRIS (TBS) y TRIS/EDTA (TE). En una realización de la presente invención, el regulador comprende además $MgCl_2$. El $MgCl_2$ – si se presenta – se presenta normalmente en concentraciones de entre 0,005 y 3 M, preferiblemente de entre 0,01 y 1 M, más preferiblemente, de entre 0,01 y 0,5 M, por ejemplo, 25 mM. Normalmente, aproximadamente 0,07 $\mu mol/L$ de SOMAmers serían suficientes para la detección de 10^7 células de microorganismos diana en una muestra. En una realización preferida, se usa una
25 concentración de SOMAmer de 0,01 a 10 $\mu mol/l$ de regulador.

30 La incubación se realiza normalmente a temperaturas de entre 16 °C y 30 °C, preferiblemente de entre 18 °C y 28 °C, más preferiblemente, a temperatura ambiente. El período de tiempo para incubación es de entre 1 y 60 min, preferiblemente, de entre 5 y 30 min. La concentración de SOMAmers que se usa de acuerdo con la presente invención puede determinarse por una persona experta en la técnica.

35 De manera opcional, el método de acuerdo con la presente invención puede incluir una etapa de lavado de la muestra. Durante esta etapa, cualquier SOMAmer no unido puede lavarse antes de detectar la presencia de SOMAmer unido. Normalmente, el lavado se refiere a que la muestra se centrifuga y el sedimento se resuspende en regulador. La etapa de lavado puede realizarse una vez o varias veces repetidas, por ejemplo, dos veces, 3 veces o 4 veces.

40 En la etapa c) de acuerdo con la presente invención, la muestra se analiza mediante un método de detección basado en fluorescencia. El método de detección basado en fluorescencia se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste de citometría de flujo, citometría de fase sólida, métodos analíticos basados en fluorescencia, y sistema de imágenes por fluorescencia (tal como microscopía de fluorescencia).

45 La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición de luz difusa y emisión de fluorescencia que se produce mediante células únicas que se iluminan.

50 Normalmente, las células o partículas para analizar se suspenden en un líquido y pasan individualmente a través de un rayo láser. La luz difusa (que se relaciona con el tamaño de partícula y complejidad) y emisiones de fluorescencia (debido al etiquetado con fluorescencia de la partícula/célula diana) de cada partícula se recolecta por detectores y se envía a un ordenador. Debido a que cada partícula o célula se interroga por separado, los resultados representan características citométricas individuales acumuladas (Alvarez-Barrientos et al. 2000, Clin Microbiol Rev, 13(2): 167-195).
55

La muestra que puede contener el analito diana se mezcla con un reactivo específico con respecto al analito diana (por ejemplo, los SOMAmers de acuerdo con la presente invención) que se etiquetan con una molécula fluorescente adecuada. Después de aplicar las condiciones de unión adecuadas y etapas de lavado opcionales, la muestra etiquetada se procesa luego mediante el citómetro de flujo: las células pasan individualmente a través del rayo láser y la luz difusa y señal de fluorescencia que resultan se analizan para recolectar información que se relaciona con el analito diana (por ejemplo, células).
60

Un sistema de imágenes por fluorescencia proporciona una imagen de objetos observados (por ejemplo, células únicas, microcolonias) que se forma usando luz que se emite a partir de un fenómeno de fluorescencia (Barrett and Myers 2003, Foundations of Image Science. In Wiley Series in pure and Applied Optics ed. Saleh B.E.A. USA, New Jersey, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc). La microscopía de fluorescencia es un ejemplo de un sistema de imágenes
65

5 por fluorescencia en la que las características que se visualizan son pequeñas y se obtienen a través de un aumento óptico. La muestra que puede contener el analito diana se mezcla con un reactivo específico con respecto al analito diana (por ejemplo, SOMAmers) que se etiquetan con una molécula fluorescente adecuada. Después de aplicar las condiciones de unión adecuadas y etapas de lavado opcionales, la muestra etiquetada se coloca en el objetivo del microscopio. Los parámetros del microscopio se configuran para coincidir con las propiedades de etiqueta fluorescente.

10 La citometría de fase sólida es un método para detectar partículas/células únicas en una superficie sólida. Normalmente, la citometría de fase sólida se realiza en una membrana. El sistema de cuantificación basado en imagen proporcionará la cantidad, tamaño y forma de cualquiera de los marcadores seleccionados en conjunto con su posición en la membrana. La muestra, que puede contener el analito diana, se filtra en un filtro de membrana negra (por ejemplo, poliéster o policarbonato) con un tamaño de poro apropiado (a saber, de 0,4 µm por bacteria). Luego, las células retenidas se etiquetan con un reactivo específico con respecto al analito diana (por ejemplo, SOMAmers) etiquetado con una molécula fluorescente adecuada. El filtro se escanea posteriormente con un láser que permite eventos fluorescentes (por ejemplo, microorganismos etiquetados) en la membrana para detectar mediante una serie de unidades de detección. Esto permite la detección y enumeración del analito diana en una membrana (Reynolds y Fricker 1999, J Appl Microbiol 86, 785-795; Vanhee et al. 2009, Nat Protoc 4, 224-231).

20 El método analítico basado en fluorescencia es un método que mide una cantidad general de señal de fluorescencia que se usa para detectar y/o medir la cantidad de un analito diana que se ha etiquetado con una etiqueta fluorescente adecuada (Skoog et al. 2007, Principles of Instrumental Analysis, Sexta edición., USA, California, Belmont: Brooks/Cole). Este tipo de método puede implementarse en un amplio rango de soportes (por ejemplo, microplaca, tubo, microtubo, dispositivo microfluídico).

25 La muestra que puede contener el analito diana se mezcla con un reactivo específico con respecto al analito diana (por ejemplo, SOMAmers) etiquetado con una molécula fluorescente adecuada. Después de aplicar condiciones de unión adecuadas y etapas de lavado opcionales, el recipiente con la muestra etiquetada (por ejemplo, microplaca, tubo) se expone a una longitud de onda específica dirigida a excitar al colorante fluorescente de manera adecuada. La emisión de fluorescencia, que ocurre como una consecuencia de la unión entre el analito diana y el reactivo fluorescente, se recolecta mediante un sensor de luz adecuado. Esta cantidad de fluorescencia se cuantifica mediante el sensor y se procesa en correlación con datos de referencia para proporcionar una medida del analito.

30 Cualquier molécula fluorescente puede usarse con cualquier método de detección basado en fluorescencia. El requisito clave es la disponibilidad para un método de detección determinado de una fuente de excitación adecuada y un detector de fluorescencia adecuado para la molécula fluorescente elegida.

35 Ejemplos de combinaciones de longitudes de onda que se usan para detección de fluorescencia (etiquetas fluorescentes adecuadas):

40 – Excitación: 488 nm (láser Azul) + Emisión: 530 nm (fluoresceína, Alexa Fluor® 488), 585 nm (R-ficoeritrina - R-PE) y >670 nm (Peridina-clorofila - PerCP)

45 – Excitación: 532 - 561 nm (Láser Verde y Amarillo/Verde) + Emisión: 560 (Alexa Fluor® 532), 585 (R-PE - R-Ficoeritrina)

– Excitación: 635 nm (Láser Rojo) + Emisión: 660 nm (Aloficocianina-APC / Cianina 5 - Cy5 / eFluor® 660 / Alexa Fluor® 647)

50 El método de acuerdo con la presente invención proporciona varias ventajas en cuanto al uso de anticuerpos:

- Termoestabilidad en solución excepcional
- Peso molecular bajo
- 55 – Capacidades de multiplexación mayores
- Estabilidad química con respecto al calor, secado y solventes,
- 60 – Renaturalización reversible
- Facilidad de fabricación de reactivo
- Rendimiento lote a lote consistente
- 65 – Coste más bajo

5 La invención se refiere además a un aptámero modificado de constante de disociación lenta (SOMAmer) que comprende una etiqueta fluorescente, en la que el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos específica para *Staphylococcus aureus*, según se define en las reivindicaciones 7 y 8.

El SOMAmer, la etiqueta fluorescente, así como también sus realizaciones preferidas, se definen según se describe anteriormente.

10 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente, que se caracteriza porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16 o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas, según se define en la reivindicación 8.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente, caracterizado porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12 o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas, según se define en la reivindicación 7.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente, caracterizado porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, según se define en la reivindicación 9.

25 En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente según se define anteriormente para detectar células de *Staphylococcus aureus* en una muestra, según se define en la reivindicación 10.

30 Los SOMAmers de acuerdo con la presente invención pueden encontrarse inmovilizados en (por ejemplo, unidos o adheridos a) un sustrato o transportador, por ejemplo, un microtransportador.

La invención se refiere además a un microarreglo o biosensor que comprende al menos uno de los SOMAmers que comprenden una etiqueta fluorescente según se define anteriormente, según se define en la reivindicación 11.

35 Un biosensor es un dispositivo analítico para la detección de un analito diana, que convierte una respuesta biológica en una señal eléctrica. Las aplicaciones de biosensor usan elementos de reconocimiento biológico tales como enzimas, anticuerpos y ácidos nucleicos, para detectar la molécula diana. Un biosensor normal contiene tres componentes: un elemento sensorial biológico que puede reconocer o unirse al analito, un elemento de transducción que convierte el evento de detección en una señal que puede medirse, y un indicador que transforma la señal en un formato digital. El elemento sensor define en primer lugar la selectividad y sensibilidad del biosensor. La detección de los analitos se basa usualmente en detectar los analitos con ya sea lectura eléctrica u óptica. Los SOMAmers que comprenden una etiqueta fluorescente de acuerdo con la presente invención pueden usarse como elementos biológicos en la aplicación de biosensor.

45 La presente invención se refiere en una realización adicional a un kit que comprende al menos un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente según se define anteriormente, según se define en la reivindicación 12. El kit de acuerdo con la presente invención puede ser un kit de ensayo de detección rápida. El kit puede comprender, por ejemplo i) al menos un (tales como 2, 3 o 4) SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente de acuerdo con la presente invención y ii) instrucciones sobre cómo usar los SOMAmers.

50 Descripción de las Figuras:

Figura 1: Detección de *Staphylococcus aureus* mediante citometría de flujo después de coloración de 10^7 células con diferentes concentraciones de SOMAmers de SpA 4520-8 (SEQ ID NO:3) y 4531-56 (SEQ ID NO:1) etiquetados con fluorescencia (15 min de reacción de unión).

60 (a) Representación de las intensidades medias de fluorescencia (columnas) y los porcentajes de células teñidas (línea) que se obtienen a diferentes concentraciones de SOMAmers (n=3). Columnas grises: intensidad media fluorescente con 4520-8 (SEQ ID NO:3), columnas negras: intensidad media de fluorescencia con 4531-56 (SEQ ID NO:1). Línea negra: porcentajes de células teñidas con ya sea 4520-8 (SEQ ID NO:3) o 4531-56 (SEQ ID NO:1) (datos idénticos).

65 (b) Ejemplo de resultados de citometría de flujo que se obtienen con SOMAmers de SpA 4531-56 (SEQ ID NO:1). Área negra: población de células no teñidas; población de células teñidas con $0,07 \mu\text{mol l}^{-1}$ (verde claro), $0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ (verde oscuro) y $7 \mu\text{mol l}^{-1}$ (línea negra sólida). Los intervalos M1 y M2 se configuran para incluir en M1 la señal de fluorescencia de las células no teñidas de control (autofluorescencia). Por lo tanto, las poblaciones de células que se ubican en el intervalo M2 se consideran como teñidas.

Figura 2: Detección de *Staphylococcus aureus* mediante citometría de flujo después de coloración de 10^7 células con SOMAmers de SpA 4531-56 (SEQ ID NO:1) etiquetados con fluorescencia a $7 \mu\text{mol}^{-1}$. Comparación de tiempos de coloración diferentes ($n=3$). Intensidades medias de fluorescencia se representan en columnas y porcentajes de células teñidas como gráfico lineal.

Figura 3: Detección de *Staphylococcus aureus* mediante citometría de flujo después de coloración de 10^7 células con SOMAmers de SpA 4531-56 (SEQ ID NO:1) etiquetados con fluorescencia a $0,7 \mu\text{M}$. Comparación de tiempos de coloración diferentes ($n=3$). Con una incubación de coloración de 30 min, la intensidad media de fluorescencia se mejoró en 1,4 veces, en comparación con la intensidad que se obtuvo después de una incubación de coloración de 5 min.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Purificación de dianas de *S. aureus*

Porciones relevantes de los genes que codifican las dianas convenientes o dominios diana se amplifican mediante PCR a partir de ADN genómico NRS384 (USA300) de *S. aureus* con cebadores que se muestran en la Tabla 1 y se clonan en pCR-Script SK+ (Stratgene). Los genes *clfA* se transfieren como casetes *Bam*HI-*Sac*I en el vector de expresión pET-51b (EMD-Novagen) que alberga una etiqueta de Strep aminoterminal y una etiqueta de His₁₀ carboxiterminal. Los plásmidos se secuencian para verificar la identidad génica y fusión génica adecuada del fragmento de ADN clonado con las secuencias codificadas por vector para la etiqueta de His y etiqueta de Strep.

Tabla 1: Amplificación y clonado de genes que codifican proteínas de superficie celular de *S. aureus*

Diana	Cebadores de PCR (delantero y trasero, con sitios restringidos subrayados)			Proteína recombinante	
	Nombre	Sitio RE	Secuencia 5'	Rango aa	Tamaño (kDa)
ClfA	clfA-3	<i>Bam</i> HI	<u>CGGATCC</u> AGTAGCTGCAGATGCACC	221-550	45
	clfA-3	<i>Sac</i> I	CGAGCTC <u>GCTCATC</u> AGGTTGTTTCAGG		

Las proteínas recombinantes se sobreexpresan en *E. coli* BL21 (DE3) o en BL21 (DE3)/pLysE (EMD/Novagen). Las condiciones para expresión óptima de proteínas solubles se optimizan con respecto a la temperatura de crecimiento (25-37 °C) y tiempo de inducción (4-15 h). Las células a partir de cultivos de 0,1-0,8 L se lisan con reactivo de BugBuster/ Benzonase 10 mL (EMD Millipore). El recombinante, proteínas etiquetadas con His₁₀/Strep se purifican a partir de fracción soluble mediante cromatografía por afinidad secuencial en agarosa Ni-NTA y agarosa Strep•Tactin® Superflow™ (EMD Millipore). La proteína A estafilocócica nativa se adquiere a partir de VWR y se biotinizila con NHS-PEG4-biotina (Pierce Biotechnology). Las concentraciones de proteína se determinan usando el kit de ensayo de proteína Quick Start Bradford (BioRad).

Ejemplo 2: Selección de SOMAmers

Bibliotecas génicas separadas con 5- bencilaminocarbonilo-dU (BndU), 5-naftilmetilaminocarbonilo-dU (NapdU), y 5-triptaminocarbonilo-dU (TrpdU) se usan para SELEX con las proteínas de *S. aureus*. Cada selección comienza a partir de secuencias de 1nmol (10^{14} - 10^{15}) que contienen 40 posiciones al azar consecutivas flanqueadas mediante secuencias fijas que se requieren para amplificación mediante PCR. SELEX se realiza esencialmente según se describe (Gold et al. 2010, PLoS One 5: e15004; Ochsner et al. 2013, Diagn Microbiol Infect Dis.; Vaught et al. 2010, J Am Chem Soc 132: 4141-4151). Regulador SB18T se usa a través de SELEX y ensayos de unión posteriores, que consiste de HEPES 40 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, y Tween-20 al 0,05%. Ocho rondas de selección se llevan a cabo, y, comenzando con la ronda 2, un cambio cinético con sulfato de dextrano 10 mM se realiza para favorecer las constantes de disociación lentas. La división de los complejos de SOMAmer-diana se logra con Talon Dynabeads® Talon® paramagnético (Invitrogen) que une la etiqueta de His₁₀ en las proteínas recombinantes, o con perlas de estreptavidina MyOne C1 (Life Technologies) para el SpA biotilado. Las secuencias seleccionadas se eluyen a partir de las dianas unidas a perlas con 80 μl de NaOH 40 mM, neutralizado con 20 μl de HCl 160 mM, y se amplifican mediante PCR usando polimerasa de ADN KOD EX (Invitrogen-Life Technologies). El ADN modificado para la próxima ronda se prepara con polimerasa de ADN KOD EX mediante extensión de cebador a partir de la cadena antisentido de los productos de PCR y se purifica según se describe (Gold et al., 2010).

El análisis de reasociación cinética de ADN (Cot) del ADN seleccionado a partir de las rondas 3 a 8 se usa para la evaluación de la convergencia de secuencias durante las rondas posteriores, indicando abundancia aumentada de algunas secuencias o familia de secuencias. Las reservas de SOMAmers que demuestran buena afinidad ($K_d \leq 10$ nM)

en radioensayos de unión de solución (véase a continuación) se clonan y las secuencias de 48 clones por reserva se determinan. Los SOMAmers individuales se eligen sobre la base de los patrones de secuencia y diversidad y se preparan enzimáticamente para caracterización adicional.

5 Los SOMAmers sintéticos se preparan como 48-50-mers a escala de 1 μ mol mediante química de fosforamidita estándar y HCPL purificado. Estos contienen un 5'biotina-dA o 5'fluoresceína-biotina-dA, y un nucleótido dT invertido en el extremo 3' (3'idT) para agregar estabilidad a exonucleasas 3' a 5'.

10 Ejemplo 3: Equilibrio de SOMAmers y ensayos de unión de radioetiqueta de célula entera

Los SOMAmers se pliegan adecuadamente mediante calor durante 5 min a 95 °C, continuando con enfriamiento a temperatura ambiente durante un período de 10-15 min, antes de los ensayos de unión.

15 Las afinidades (K_d 's) se determinan en ensayos de unión de solución de equilibrio de SOMAmers radioetiquetados (10-20 pM) con proteínas diluidas en serie (0,001-100 nM) y resina Zorbax PSM-300A (Agilent Technologies) para dividir en placas de filtro según se describe (Gold et al. 2010).

20 Antes de la clonación, las reservas de SOMAmers se evalúan también para unión específica a *S. aureus*, usando *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, y *P. aeruginosa* como controles en ensayos de unión de equilibrio de 2 h. Las densidades celulares varían de 10^5 - 10^8 CFU/mL, y se agregan sulfato de dextrano 0,1 mM y NaCl 0,35 M al regulador de unión para reducir el fondo no específico. De manera adicional, aptámeros de ácido nucleico individuales se analizan para unión a 8 diferentes cepas de *S. aureus* que corresponden a diferentes linajes, incluyendo NRS382, NRS383, NRS384, NRS123, NRS385, NRS386, NRS103 (NARSA), y ATCC 29213 (ATCC).

25 Resultados:

30 Los ensayos de afinidad de reserva confirman la selección exitosa de SOMAmers para un total de 22 reservas que se obtienen con BndU, NapdU, o ADNmc modificado con TrpdU, con afinidades de reserva en el rango de 0,13-8,90 nM. Se observa la unión específica a células de *S. aureus*, pero sin unirse a *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, o *P. aeruginosa*.

El alineamiento de secuencias que se determinó para 48 clones a partir de cada reserva muestra clones multicopia y familias que comparten patrones de secuencia comunes.

35 Clones representativos se evalúan en ensayos de afinidad, y las K_d 's de los mejores SOMAmers se encuentran en el rango de 0,03-2,17 nM (Tabla 2).

Tabla 2: Reactivos de SOMAmers para proteínas de superficie celular de *S. aureus*, con afinidad (K_d) que se muestra para las secuencias de longitud completa originales que se obtienen en SELEX

Diana	Caracterización de SOMAmer		
	Sec no	Modificado	K_d (nM)
SPA	4520-8 (SEQ ID NO:3)	NapdU	0,22
SPA	4531-56 (SEQ ID NO:1)	TrpdU	0,03
CIfA	4503-73 (SEQ ID NO:12)	BndU	0,79

40 Las afinidades de unión de SOMAmers con respecto a proteínas de *S. aureus* se correlacionan bien con la unión observada con respecto a la bacteria entera. Un clon de SpA-NapdU (4520-8; SEQ ID NO:3) y uno del clon tSpA-TrpdU (4531-56; SEQ ID NO:1) son capaces de unir células enteras de todas las cepas de *S. aureus* que se evaluaron, con un límite de detección de $\sim 10^4$ células por pozo (10^5 - 10^6 células/mL) en un ensayo de unión de filtro de radioetiqueta. La unión a células de *S. epidermidis* o *S. hemolyticus* no se observa, lo que indica buena especificidad de estos SOMAmers. Características de unión similares se observa para los SOMAmers de CIfA. Las secuencias de los SOMAmers se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3: Secuencia de SOMAmers:

Diana	Sec no	SEQ ID	Secuencia
SpA	4531-56	SEQ ID NO:1	GCTCGAGTTAATTCGGGATCGGGCTCCGGCTTTT CGAAT
SpA	4520-3	SEQ ID NO:2	CCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CATAA
SpA	4520-8	SEQ ID NO:3	TCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CAGAA
SpA	4520-20	SEQ ID NO:4	GCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CAAAA
SpA	4520-23	SEQ ID NO:5	GTGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CAGAA
SpA	4520-27	SEQ ID NO:6	GCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCTGT CAGGA
SpA	4520-30	SEQ ID NO:7	GTGATCGAGCGGCTTCGGGTACCTATTATTGGTTT AGCCCAGTCAGAA
SpA	4520-42	SEQ ID NO:8	TCGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCCAGT CTGAA
SpA	4520-44	SEQ ID NO:9	ACGGCTTCGGGTACCTATTATCGGTTTAGCCA- GTCAGAA
ClfA	4503-66	SEQ ID NO:10	ATCTGGTTCAAAGTGACGATTGGGCATCTGGTTTT TAAGT
ClfA	4503-68	SEQ ID NO:11	ATCTGGTTCTAAGTTACTTGGCGTAATCTGGTTTTT AAGA
ClfA	4503-73	SEQ ID NO:12	ATCTGGTTCAAAGTGCGGATTGGGCATCTGGTTTT TAAGT

5 El nucleótido "T" para las secuencias que se proporciona en la Tabla 3 son pirimidinas modificadas en C-5. Más específicamente, el nucleótido "T" para los SOMAmers que se dirigen a la proteína SpA son nucleótidos NapdUTP (o NapdU), y el nucleótido "T" para los SOMAmers que dirigen a la proteína ClfA es nucleótido BndUTP (o BndU).

10 Además, el motivo (4520) para la secuencia de aptámeros que se une a la proteína SpA se representa mediante la siguiente secuencia: GGCWWCGGGWACCWAWWAWNGGWWWAGCC(N)_nGWC (SEQ ID NO: 15), en el que la "W" en la secuencia representa una posición que se ocupa por una pirimidina modificada en C-5, y "N" representa una posición que se ocupa por cualquier nucleótido sin modificar o modificado, y n resulta de 0 a 2 (o 0, 1 o 2). La pirimidina modificada en C-5 es un NapdU o un BndU. Preferiblemente, la pirimidina modificada en C-5 es un NapdU.

15 El motivo (4503) para la secuencia de aptámero que se une a la proteína ClfA se representa mediante la siguiente secuencia: AWCWGGWC(N)_nAWCWGGWWWWWAAG (SEQ ID NO: 16), en el que la "W" en la secuencia representa una posición que se ocupa por una pirimidina modificada en C-5, y "N" representa una posición que se ocupa por cualquier nucleótido sin modificar 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). Preferiblemente, n es 16. La pirimidina modificada en C-5 es un NapdU o un BndU. Preferiblemente, la pirimidina modificada en C-5 es un BndU.

Ejemplo 4: Detección de células de *Staphylococcus aureus* mediante citometría de flujo

5 Los SOMAmers con respecto a Proteína A (SpA) se sintetizan según se describe anteriormente como 48-mers que
 6 contienen 5'ABfIT (biotina y fluoresceína), para uso en experimentos de citometría de flujo. La actividad se confirma
 7 para 4520-8 (SEQ ID NO:3) ($K_d=0,17$ nM) y 4531-56 (SEQ ID NO:1) ($K_d=0,09$ nM). Caldo de soja tréptica (TSB;
 8 bioMérieux, Craaponne, Francia) se inocula con un cultivo conservado congelado de *Staphylococcus aureus* DSM 1104
 9 (o ATCC 25923) y se incuba durante la noche a 32,5 °C con agitación. El cultivo durante la noche se subcultiva luego
 10 en TSB fresco a 32,5 °C con agitación hasta que el cultivo de trabajo alcanza un OD600 de 0,8 (aproximadamente 10^8
 11 bacterias ml^{-1}) y se divide en alícuotas de aproximadamente 10^7 células por tubo. Las bacterias se cosechan mediante
 12 centrifugación a 10 000 g durante 2 min. Los sedimentos se resuspenden en 100 μl de PBS / MgCl_2 25 mmol l^{-1} que
 13 contienen los SOMAmers en un rango de concentraciones (0,07 – 7 μmol^{-1}). Después de la incubación a temperatura
 14 ambiente durante 5, 15 o 30 min, las bacterias se centrifugan a 10 000 g durante 2 min y los sedimentos se
 15 resuspenden con PBS / MgCl_2 25 mmol l^{-1} . La etapa de lavado se repite dos veces. Los controles de las bacterias no
 16 teñidas se incluyen al seguir el mismo protocolo sin el agregado de los SOMAmers. Las bacterias no teñidas y teñidas
 17 se analizan luego mediante citometría de flujo. Todos los experimentos se realizan con un citómetro de flujo
 18 FACSCalibur™ (Becton Dickinson Biosciences; Le Pont de Claix, Francia) que se equipa con un láser de iones de
 19 argón de 15 mW refrigerado por aire que emite a 488 nm. La fluorescencia verde se recolecta en el canal FL1 (530 \pm
 20 30 nm) como señal logarítmica. La intensidad media de fluorescencia y el porcentaje de células fluorescentes ($n=$
 21 10000 en la puerta definida) que ocurre como una consecuencia de unión de SOMAmers se determina en estos
 22 ensayos. Los datos a partir del FACSCalibur™ se analizan usando el software BD CellQuest™ (Becton Dickinson
 23 Biosciences).

Resultados:

24 Los SOMAmers de SpA etiquetadas con fluorescencia 4520-8 (SEQ ID NO:3) y 4531-56 (SEQ ID NO:1) se usan para
 25 evaluar su eficiencia para la detección de *S. aureus* mediante citometría de flujo. Ambos SOMAmers funcionan bien
 26 en cuanto a la coloración de células enteras de *S. aureus*. Mientras que el 100% de las células se encuentran ya
 27 teñidas a una concentración de SOMAmers de SpA baja de 0,07 μmol^{-1} , las intensidades medias de fluorescencia
 28 aumentan sustancialmente a concentraciones de reactivo más altas de 0,7 μmol^{-1} y 7 μmol^{-1} (Figura 1a). Los datos
 29 son consistentes con el aumento esperado en saturación de componentes de superficie celular altamente abundantes
 30 con los SOMAmers etiquetados con fluorescencia. La concentración mínima de SOMAmers de SpA para asegurar
 31 una discriminación precisa mediante citometría de flujo entre las poblaciones negativas (células no teñidas) y las
 32 poblaciones positivas (células teñidas) puede configurarse a 0,07 μmol^{-1} (Figura 1b).

33 Con el fin de definir el tiempo de unión óptimo, se realiza un ensayo de línea de tiempo. Después de una reacción de
 34 unión de solo 5 min, el 100% de las células ya se tiñeron en la presencia de SOMAmers de SpA 7 μmol^{-1} (Figura 2).
 35 Al aumentar el tiempo de unión a 15 y 30 minutos, las intensidades de fluorescencia se mejoran en alrededor de 2
 36 veces y 3 veces, respectivamente conduciendo a una mejor discriminación entre la población negativa y la población
 37 positiva. Este aumento de intensidad de fluorescencia resulta menos pronunciado cuando las células se etiquetan con
 38 una concentración de SOMAmers de SpA más baja (0,7 μmol^{-1}), probablemente debido a la limitación de la
 39 concentración de SOMAmers (Figura 3).

40 Los SOMAmers de SpA demostraron tener una alta eficiencia de coloración para *S. aureus*. En las condiciones
 41 experimentales, la detección óptima de *S. aureus* mediante citometría de flujo se logra en un procedimiento simple de
 42 una etapa usando una concentración de reactivo baja (0,7 μmol^{-1}), y un tiempo de unión corto (15 min). Los aptámeros
 43 de ADN ya han sido informados para la detección de *S. aureus* basada en citometría de flujo usando aptámeros únicos
 44 o combinado (Cao et al. 2009) o para la detección de *Salmonella typhimurium* usando aptámeros que se generan
 45 mediante SELEX de célula entera (Dwivedi et al. 2013). Sin embargo, los porcentajes de células etiquetadas con
 46 aptámero que se obtienen en estos estudios no se aproximan al 100% y las intensidades de fluorescencia fueron
 47 débiles en comparación con las intensidades de fluorescencia que se obtuvieron con los SOMAmers de la presente
 48 invención.

Ejemplo 5: Comparación de SOMAmers de acuerdo con la presente invención con aptámeros estándares

49 Debido a la característica única de constante de disociación lenta de los SOMAmers de acuerdo con la presente
 50 invención, estos reactivos deberían tener una mejor afinidad y mejores propiedades cinéticas en comparación con
 51 aptámeros de ADN o ARN. Con el fin de demostrar esta declaración, los SOMAmers de SpA de acuerdo con la
 52 presente invención se comparan con aptámeros de ADN específicos con respecto a *S. aureus* (antígeno diana
 53 desconocido).

54 Los aptámeros de ADN se fabrican mediante Tecnologías de ADN Integradas.

55 El protocolo para tanto los aptámeros inventivos y los aptámeros estándares es el mismo que el que se describe en el
 56 Ejemplo 4 (a excepción de los aptámeros estándares: sin calentamiento de los aptámeros antes del ensayo; PBS se
 57 usa como el regulador de unión).

ES 2 736 474 T3

Los resultados de citometría de flujo que se obtienen con *S. aureus* DSM 1104:

	Concentración de aglutinantes	Tiempo de unión	Porcentaje de células teñidas	Intensidad media de fluorescencia
SOMAmers (4531-56; (SEQ ID NO:1))	0,7 μmol^{-1}	5 min	100%	331
Aptámeros estándares	159 μmol^{-1}	60 min	90%	265

5 El porcentaje de células teñidas que se obtuvo con 159 μmol^{-1} de aptámeros estándares no alcanza el 100% después de un tiempo de unión de 60 min. Mientras que con 0,7 μmol^{-1} de SOMAmers de acuerdo con la presente invención, el 100% de células se tiñen en solo 5 minutos. Este resultado demuestra que la eficiencia de unión de los SOMAmers de acuerdo con la presente invención es mejor que los aptámeros de ADN estándares incluso con una concentración más baja en 200 veces.

10 Este experimento demuestra el beneficio de las características de constante de disociación lenta de los SOMAmers de acuerdo con la presente invención para la detección de *S. aureus* mediante citometría de flujo: una mayor unión/eficiencia de detección puede lograrse con una concentración de reactivos más baja en un período de tiempo muy corto.

15 Listado de secuencias

<110> Merck Patent GmbH, SOMALogic Inc

20 <120> Un método para detectar un microorganismo en una muestra mediante métodos de detección basados en fluorescencia

<130> I 14/041

25 <160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

30 <211> 39

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> SOMAmer: SpA diana

<220>

<221> t

45 <222> (1)..(1)

<223> pirimidias modificadas en C-5

<400> 1

50 gctcgagta atcgggatc gggctccgc tttcgaat 39

<210> 2

<211> 40

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> SOMAmer: SpA diana
<220>
10 <221> t
<222> (1)..(1)
<223> pirimidias modificadas en C-5
15 <400> 2
ccggcttcgg gtacctatta tcggttagc ccagtcataa 40
<210> 3
20 <211> 40
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> SOMAmer: SpA diana
30 <220>
<221> t
35 <222> (1)..(1)
<223> pirimidias modificadas en C-5
<400> 3
40 tcggcttcgg gtacctatta tcggttagc ccagtcagaa 40
<210> 4
<211> 40
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> SOMAmer: SpA diana
<220>
55 <221> t
<222> (1)..(1)
60 <223> pirimidias modificadas en C-5
<400> 4
gaggcttcgg gtacctatta tcggttagc ccagtcacaaa 40
65 <210> 5
<211> 40

<212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SOMAmer: SpA diana
 10 <220>
 <221> t
 15 <222> (1)..(1)
 <223> pirimidinas modificadas en C-5
 <400> 5
 20 gtggcttcgg gtacctatta tcggttagc ccagtcagaa 40
 <210> 6
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> SOMAmer: SpA diana
 <220>
 35 <221> t
 <222> (1)..(1)
 40 <223> pirimidinas modificadas en C-5
 <400> 6
 gcggcttcgg gtacctatta tcggttagc cctgtcagga 40
 45 <210> 7
 <211> 48
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> SOMAmer: diana: SpA
 <220>
 <221> t
 60 <222> (1)..(1)
 <223> pirimidinas modificadas en C-5
 65 <400> 7
 gtgatcgagc ggcttcgggt acctattatt ggttagccc agtcagaa 48

<210> 8
<211> 40
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> SOMAmer: SpA diana
<220>
15 <221> t
<222> (1)..(1)
20 <223> pirimidinas modificadas en C-5
<400> 8
tcggcttcgg gtacctatta tcggttagc ccagtctgaa 40
25 <210> 9
<211> 39
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> SOMAmer: SpA diana
<220>
<221> t
40 <222> (1)..(1)
<223> pirimidinas modificadas en C-5
45 <400> 9
acggcttcgg gtacctatta tcggttagc cagtcagaa 39
<210> 10
50 <211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<223> SOMAmer: ClfA diana
60 <220>
<221> t
<222> (1)..(1)
65 <223> pirimidinas modificadas en C-5

<400> 10
 atctggttca aagtgacgat tgggcatctg gttttaagt 40
 5 <210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> SOMAmer: ClfA diana
 <220>
 <221> t
 20 <222> (1)..(1)
 <223> pirimidias modificadas en C-5
 25 <400> 11
 atctggttct aagtactctg gcgtaactctg gttttaaga 40
 <210> 12
 30 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> SOMAmer: ClfA diana
 40 <220>
 <221> t
 <222> (1)..(1)
 45 <223> pirimidias modificadas en C-5
 <400> 12
 atctggttca aagtggcgat tgggcatctg gttttaagt 40
 50 <210> 13
 <211> 25
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> secuencia de cebador clfA-3
 <400> 13
 cggatccagt agctgcagat gcacc 25
 65 <210> 14

<211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> secuencia de cebador clfA-4
 <400> 14
 cgagctcgct catcaggttg ttcagg 26
 15 <210> 15
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> SOMAmer de unión a SpA
 <220>
 <221> n
 30 <222> (1)..(1)
 <223> sin nucleótido o cualquier nucleótido sin modificar o modificado
 35 <220>
 <221> W
 <222> (1)..(1)
 40 <223> pirimida modificadas en C-5
 <220>
 45 <221> misc_característica
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t
 50 <220>
 <221> misc_característica
 55 <222> (30)..(31)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 15
 60 ggcwwcgggw accwawwawn ggwwwagccn ngwc 34
 <210> 16
 <211> 23
 65 <212> ADN

<213> secuencia artificial
<220>
5 <223> SOMAmer de unión a ClfA
<220>
10 <221> W
<222> (1)..(1)
<223> pirimida modificada en C-5
15 <220>
<221> n
20 <222> (1)..(1)
<223> 1 a 30 nucleótidos sin modificar o modificados
<220>
25 <221> misc_característica
<222> (9)..(9)
30 <223> n es a, c, g, o t
<400> 16
awcwgwcna wcwggwwwww aag 23

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar *Staphylococcus aureus* en una muestra, que comprende las etapas de
 - 5 a) incubar la muestra con un aptámero modificado de constante de disociación lenta (SOMAmer) que comprende una etiqueta fluorescente, en el que el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos específica para *Staphylococcus aureus* y en el que el período de tiempo de incubación es de entre 1 y 60 minutos,
 - 10 b) de manera opcional, lavar la muestra,
 - 15 c) analizar la muestra mediante un método de detección basado en fluorescencia, caracterizado porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16 o un fragmentos de estas o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas, o se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12 o un fragmentos de estas o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas, en el que el fragmento es una porción de la secuencia de nucleótidos que tiene la misma o mejor afinidad, especificidad o actividad funcional para *Staphylococcus aureus* en comparación con la secuencia completa.
- 20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el método de detección basado en fluorescencia es un método que se selecciona del grupo que consiste de citometría de flujo, citometría de fase sólida, métodos analíticos basados en fluorescencia, y sistema de imágenes por fluorescencia.
- 25 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la muestra es una muestra clínica, un alimento o muestra de alimentación, una muestra de bebida, una muestra farmacéutica, una muestra de cuidado personal o cosmética y/o muestra de agua.
- 30 4. Un método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12
5. Un método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3
- 35 6. Un método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etiqueta fluorescente se selecciona a partir del grupo que consiste de colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina, colorantes de cianina, Peridinina-clorofila (PerCP), R-ficoeritrina, colorantes de cumarina y puntos cuánticos.
- 40 7. Un aptámero modificado de constante de disociación lenta (SOMAmer) que comprende una etiqueta fluorescente, en el que el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos específica para *Staphylococcus aureus*, caracterizado porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas, y porque la etiqueta fluorescente se selecciona a partir del grupo que consiste de colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina, colorantes de cianina, Peridinina-clorofila (PerCP), R-ficoeritrina y colorantes de cumarina, y en el que los SOMAmers que se excluyen consisten de una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:12 y con una biotina 5'fotoescindible, D-espaciador y Cy3.
- 45 8. Un aptámero modificado de constante de disociación lenta (SOMAmer) que comprende una etiqueta fluorescente, en el que el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos específica para *Staphylococcus aureus*, caracterizado porque el SOMAmer comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16, o una secuencia que es idéntica en al menos el 80% con respecto a estas, y porque la etiqueta fluorescente se selecciona a partir del grupo que consiste de colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina, colorantes de cianina, Peridinina-clorofila (PerCP), R-ficoeritrina y colorantes de cumarina, y en el que los SOMAmers que se excluyen consisten de una secuencia de nucleótidos que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:12 y con una biotina 5'fotoescindible, D-espaciador y Cy3.
- 50 9. Un SOMAmer de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque el SOMAmer comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
- 55 10. Uso de un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 7 a 9 para detectar células de *Staphylococcus aureus* en una muestra.
- 60

11. Un microarreglo o biosensor que comprende al menos uno de los SOMAmers que comprende una etiqueta fluorescente de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 7 a 9.

5 12. Un kit que comprende al menos un SOMAmer que comprende una etiqueta fluorescente de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 7 a 9.

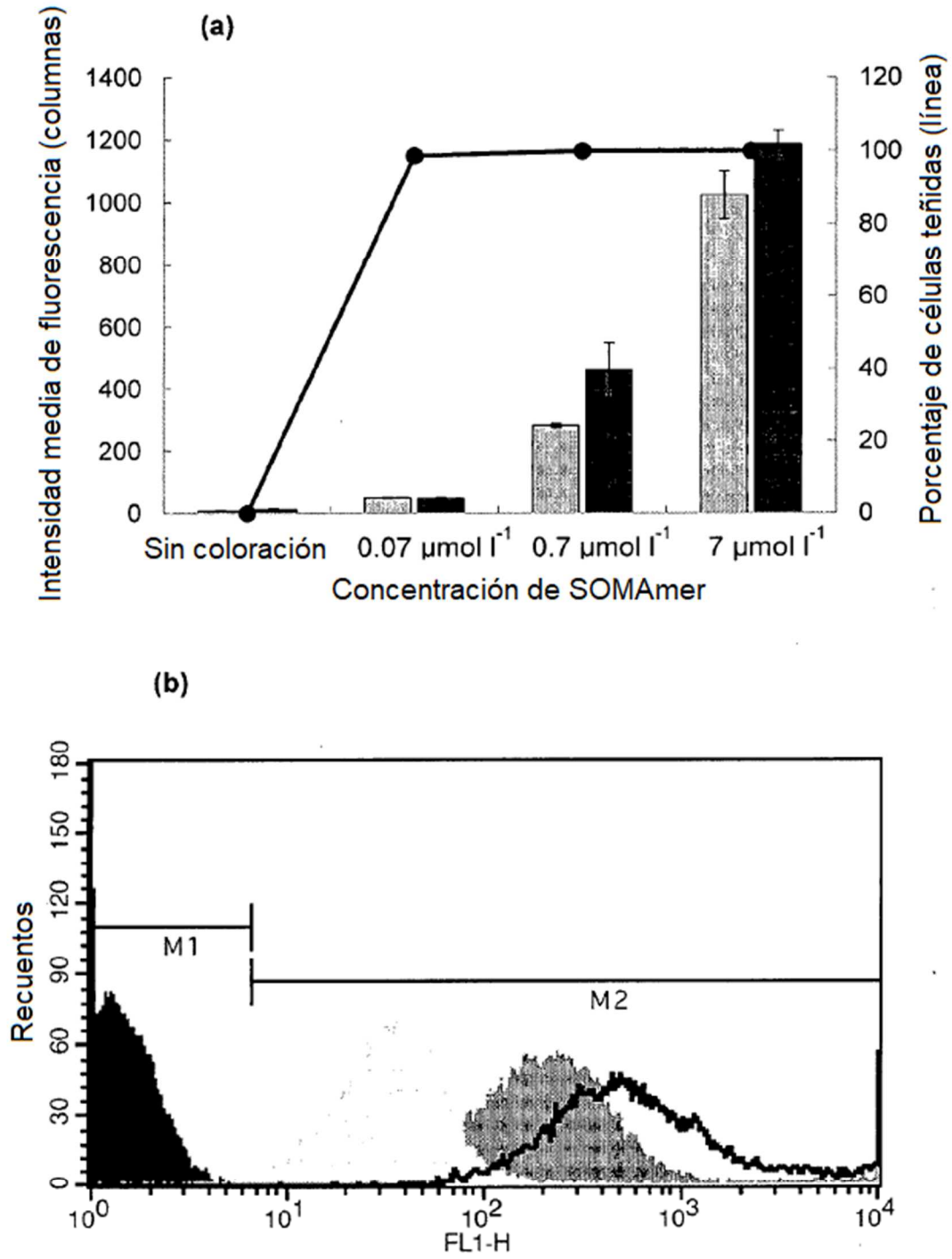


Fig. 1

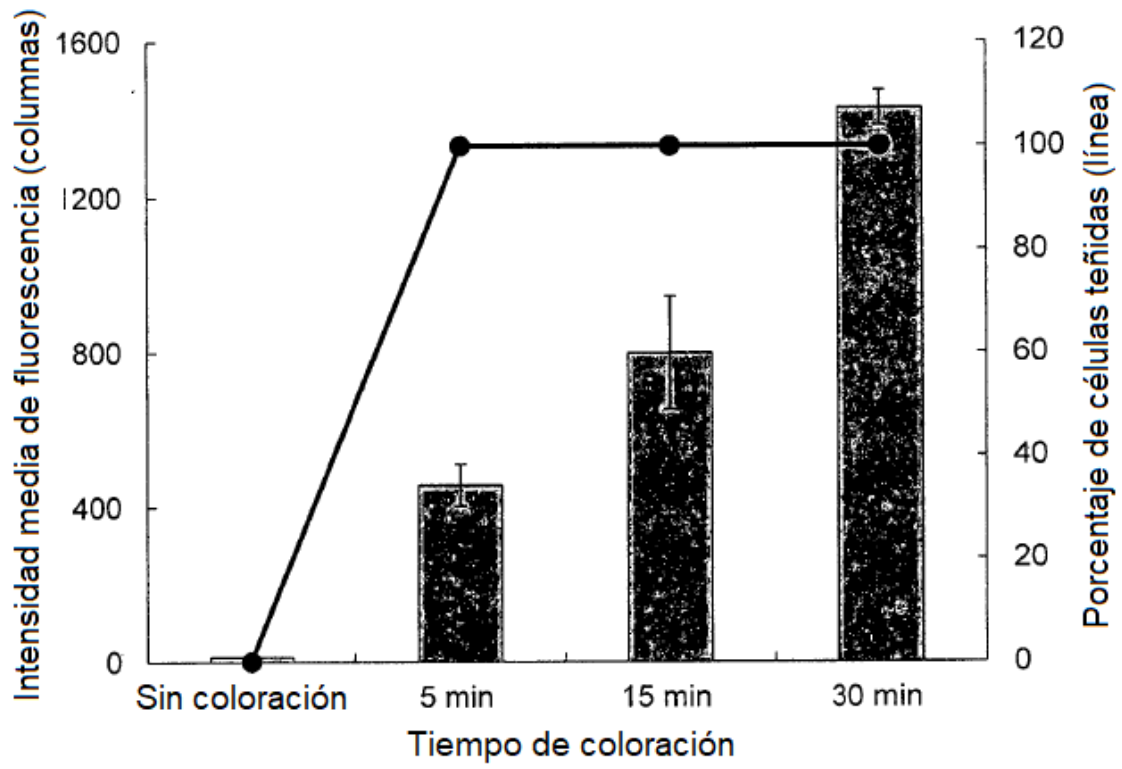


Fig. 2

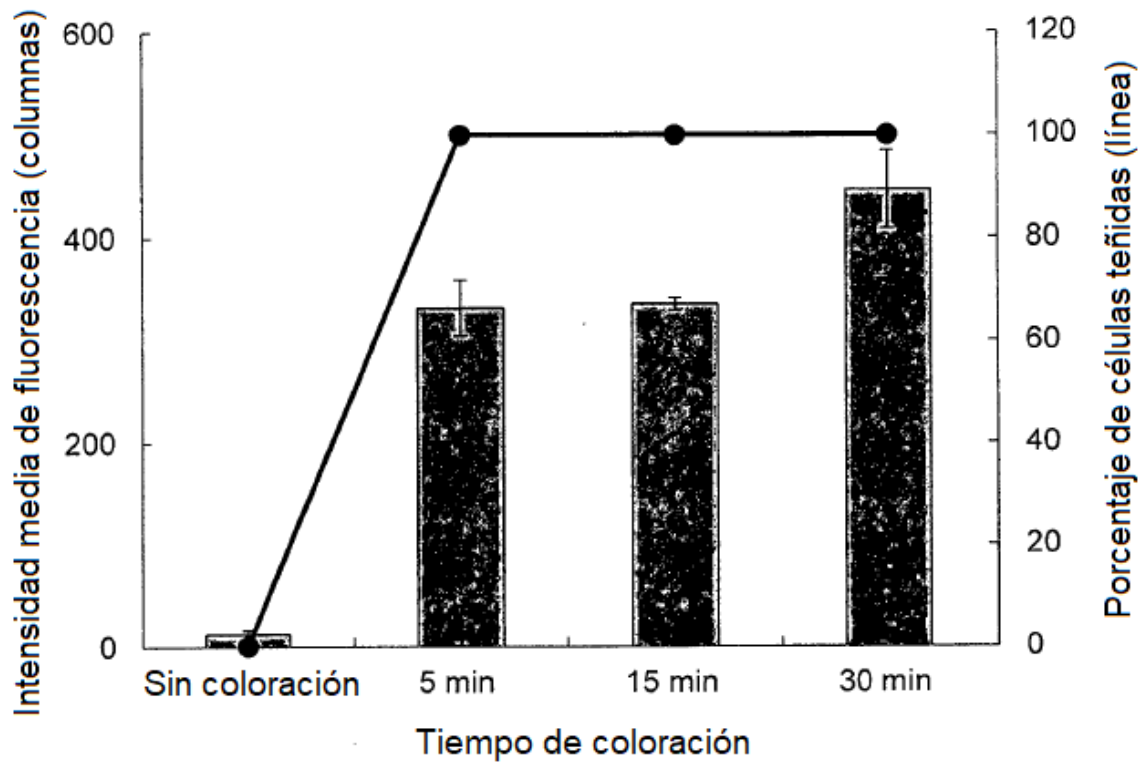


Fig. 3