

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 757**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6834** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2019** **PCT/GB2019/052361**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2020** **WO20039201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2019** **E 19759021 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 3841218**

54 Título: **Métodos de detección basados en ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**23.08.2018 GB 201813789**

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

**12.11.2024**

73 Titular/es:

**APTAMER DIAGNOSTICS LIMITED (100.0%)**  
**Windmill House, Innovation Way**  
**York YO10 5BR, GB**

72 Inventor/es:

**TOLLEY, ARRON CRAIG y**  
**BUNKA, DAVID HARRY JOHN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 757 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

Métodos de detección basados en ácidos nucleicos

## 5 Campo de la Invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren al aparato y métodos para detectar y/o cuantificar una fracción diana en una muestra que comprende el uso de un evento de recaptura basado en una molécula de ácido nucleico. En particular, aunque no exclusivamente, determinadas realizaciones de la presente invención se refieren al aparato y ensayos que comprenden un desplazamiento de una molécula de ácido nucleico inmovilizada para formar una diana-molécula de ácido nucleico y la detección de un evento de recaptura subsecuente de ya sea el complejo diana- ácido nucleico o la molécula de ácido nucleico por sí sola. Otros aspectos y realizaciones se describen en la presente.

## 15 Antecedentes de la Invención

Los aptámeros son pequeños ligandos artificiales, incluyendo ADN de cadena sencilla, ARN o moléculas polipeptídicas que son capaces de unirse a fracciones diana específicas de interés con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros se consideran como alternativas a anticuerpos para uso como agentes de diagnóstico y/o agentes terapéuticos. Además, los aptámeros también se han mostrado prometedores como sustitutos de anticuerpos en muchas aplicaciones analíticas en los campos de investigación ambiental y alimentaria, así como diagnóstico clínico.

Actualmente, los aptámeros se obtienen mediante un proceso iterativo de cribado de una biblioteca parcialmente aleatorizada de oligonucleótidos candidatos mediante una partición basada en afinidad contra la fracción diana de interés. Los aptámeros tienen una alta estabilidad estructural sobre un amplio intervalo de pH y temperaturas, lo que los convierte en reactivos ideales para un amplio espectro de aplicaciones *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

En 1990, dos grupos independientes desarrollaron un método *in vitro* que imita el proceso evolutivo para identificar aptámeros de alta afinidad, Tuerk & Gold, 1990 (Science 249, 505-510) y Ellington & Szostak 1990 (Nature 346, 818-822)). El proceso se denomina como selección *in vitro*. El proceso explota conceptos fundamentales de evolución, utilizando variación, selección y replicación para lograr alta afinidad y especificidad por la diana a partir de un conjunto inicial de moléculas de ácido nucleico degeneradas (es decir, oligonucleótidos). Típicamente, para la selección de aptámeros de ácidos nucleicos (oligonucleótidos de ADN o ARN), se logra variación sintetizando una biblioteca degenerada de oligonucleótidos cortos (alrededor de  $\sim 10^{14}$  secuencias diferentes), cuyo tamaño varía de alrededor de 20 a alrededor de 100 nucleótidos. Cada oligonucleótido generalmente comprende una región aleatoria interna flanqueada por regiones cebadoras para amplificación subsecuente mediante reacción de amplificación adecuada, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ADN, o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) seguida de reacciones de transcripción *in vitro* para ARN.

Los métodos actuales de selección de aptámero implican incubar el conjunto de ácidos nucleicos con la(s) molécula(s) diana inmovilizada(s) bajo condiciones que permitan la unión de moléculas de ácido nucleico a las moléculas diana; seguido por lavado exhaustivo para eliminar secuencias que no se unen o de baja afinidad. Las moléculas de ácido nucleico unidas se eluyen y amplifican utilizando PCR u otro método de amplificación. Las moléculas de ácido nucleico amplificadas forman entonces el material de entrada inicial para la siguiente ronda de selección *in vitro*. Este proceso se repite varias veces hasta que se enriquecen uno o más aptámeros de ácido nucleico, que se unen estrecha y específicamente a las moléculas diana. Los avances técnicos recientes en la preparación de bibliotecas aleatorias y en métodos de partición basados en afinidad han dado como resultado aptámeros con afinidades equivalentes a anticuerpos.

Se han generado aptámeros contra un diverso intervalo de moléculas diana incluyendo, por ejemplo, componentes inorgánicos, moléculas orgánicas pequeñas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y células. Como tal, los aptámeros se pueden utilizar para detectar y también cuantificar la cantidad de un producto específico en una muestra determinada.

Hay diversas ventajas de los aptámeros sobre los anticuerpos, incluyendo, por ejemplo: facilidad de síntesis *in vitro*, modificación flexible, intervalos diana amplios, reutilización y alta estabilidad térmica/química. Como resultado, los aptámeros se utilizan en lugar de anticuerpos en diversos ensayos y métodos de detección. En un ejemplo, ahora se utilizan aptámeros en lugar de anticuerpos en ensayos como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Cuando se utilizan aptámeros en lugar de anticuerpos, el ensayo resultante a menudo se denomina como un "ELONA (ensayo de oligonucleótido ligado a enzima), "ELASA" (ensayo de absorción de aptámero ligado a enzima), "ELAA" (ensayo de aptámero ligado a enzima) o similar. Incorporar aptámeros en estas plataformas de ensayo tipo ELISA puede resultar en mayor sensibilidad, permitir que se detecte un mayor número de analitos, incluyendo analitos para los cuales no hay anticuerpos disponibles y un intervalo de resultados más amplio, dado que los aptámeros se pueden conjugar a múltiples moléculas reporteras, incluyendo fluoróforos y moléculas extintoras. Otras desventajas asociadas con el uso de anticuerpos incluyen, por ejemplo, agregación inadecuada y complicaciones asociadas con el etiquetado y/o la producción de anticuerpos.

Los aptámeros también se han utilizado en diversos otros formatos de ensayo, como dispositivos de flujo lateral, biosensores y formatos de ensayo similares. Por ejemplo, Wang et al 2013 (*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids*, 32, 2, 59-68) refieren a una tira de flujo lateral de ácido nucleico para la detección del antígeno central de HCV. Gong et al 2018 (*Analytical Biochemistry*, 561, 52-58) se refiere a un biosensor de tira inmunocromatográfica basado en nanopartículas conjugadas con aptámeros. WO2007/109500A1 se refiere al dispositivo de flujo lateral. Sin embargo, permanece la necesidad de proporcionar ensayos que incorporen aptámeros con buena sensibilidad y precisión.

Las realizaciones de la presente invención pretenden superar los problemas asociados con la técnica anterior.

## Sumario De Determinadas Realizaciones De La Invención

La presente invención se refiere a ensayos que utilizan la combinación del desplazamiento de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, aptámeros) de un soporte y la posterior recaptura de dichas moléculas de ácido nucleico mediante hibridación a oligonucleótidos complementarios (por ejemplo, oligonucleótidos de captura).

Ventajosamente, cantidades más altas de una molécula diana pueden conducir al desplazamiento de más de las moléculas de ácido nucleico del soporte. A su vez, esto puede conducir a que se recapture una mayor cantidad de moléculas de ácido nucleico. Como tal, determinadas realizaciones de la invención proporcionan ensayos altamente sensibles y precisos que utilizan un formato de señal dependiente de la concentración y/o ganancia.

Ventajosamente, los oligonucleótidos de captura se pueden configurar para hibridar a secuencias de ácido nucleico comunes a cualquier aptámero obtenido de la "biblioteca de selección de aptámeros universal" como se describe en la presente. Como tal, determinadas realizaciones de la invención proporcionan ensayos universales que permiten la sustitución de aptámeros contra diferentes moléculas diana con reoptimización mínima o nula. En la presente se describen diversos aspectos y realizaciones.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato para detectar la presencia, ausencia o nivel de una molécula diana en una muestra, el aparato comprende:

a) una primera región que comprende:

- i) un soporte; y
- ii) un oligonucleótido de inmovilización; y
- iii) una molécula de ácido nucleico que tiene una afinidad de unión a una molécula diana, en la que la molécula de ácido nucleico está configurada para formar un complejo con la molécula diana,

en la que el oligonucleótido de inmovilización está unido directa o indirectamente al soporte, y además en la que el oligonucleótido de inmovilización comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico y en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse al oligonucleótido de inmovilización y además en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de ser desplazada del complejo con el oligonucleótido de inmovilización si la molécula diana está presente en la muestra; el aparato comprende además:

b) una región adicional que comprende:

- i) un soporte; y
- ii) un oligonucleótido de captura unido directa o indirectamente al soporte, en el que el oligonucleótido de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, en el que el oligonucleótido de captura está configurado para hibridarse a la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico cuando está en complejo con la molécula diana para capturar el complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana permitiendo así detectar la presencia o el nivel de la molécula diana.

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el aparato utiliza una molécula de ácido nucleico que está configurada para unirse a una molécula diana. Acertadamente, la molécula de ácido nucleico se une con alta afinidad y especificidad a la molécula diana.

Acertadamente, en la ausencia de la molécula diana, la molécula de ácido nucleico se asegura directa o indirectamente a un soporte para inmovilizarla. La molécula de ácido nucleico puede estar unida mediante hibridación a un oligonucleótido de inmovilización que a su vez está unido directa o indirectamente al soporte.

Determinadas realizaciones de la presente invención utilizan la capacidad de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un aptámero, para cambiar de conformación cuando se une a su molécula diana. El cambio conformacional ocasiona que la molécula de ácido nucleico se disocie del oligonucleótido de inmovilización, liberando así la molécula

de ácido nucleico en complejo con la molécula diana. Si la molécula diana no está presente, la molécula de ácido nucleico no sufre el cambio de conformación y, como tal, permanece hibridada al oligonucleótido de inmovilización.

5 Acertadamente, una molécula enlazadora está unida al soporte y en la que la molécula enlazadora está configurada para hibridar al oligonucleótido de inmovilización y además en el que la molécula de ácido nucleico está configurada para hibridar al oligonucleótido de inmovilización cuando el oligonucleótido de inmovilización se hibrida a la molécula enlazadora.

10 Además, determinadas realizaciones de la presente invención utilizan un evento de "recaptura" en el que la molécula de ácido nucleico cuando está en complejo con la molécula diana es capturada por un oligonucleótido de captura. El evento de recaptura puede entonces permitir la presencia de la molécula diana y opcionalmente también la cantidad de molécula diana que se va a detectar.

15 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, en el que el oligonucleótido de captura está configurado para hibridarse a la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico cuando está en complejo con la molécula diana para capturar el complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana.

20 En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una región de secuencia de ácido nucleico fija. La región de secuencia de ácido nucleico fija puede ser una región cebadora. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la región de secuencia de ácido nucleico fija de la molécula de ácido nucleico.

25 En determinadas realizaciones, la región de secuencia de ácido nucleico fija puede ser una secuencia que se utiliza universalmente en el diseño de una biblioteca de aptámeros de manera que cada aptámero que se selecciona de la biblioteca comprende la secuencia de ácido nucleico fija. Por lo tanto, se puede diseñar un aparato con un oligonucleótido de captura que es capaz de hibridarse a múltiples aptámeros, teniendo cada aptámero una o más regiones que tienen la misma secuencia de ácido nucleico predeterminada mientras que también son específicos a una molécula diana diferente.

30 En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una primera región de secuencia de ácido nucleico fija y una segunda región de secuencia de ácido nucleico. Por lo tanto, la primera molécula de ácido nucleico puede ser un cebador delantero y la segunda molécula de ácido nucleico puede ser un cebador reverso. En determinadas realizaciones, la primera región de secuencia de ácido nucleico fija está localizada en una región del extremo 5' de la molécula de ácido nucleico y la segunda región de secuencia de ácido nucleico fija está localizada en una región del extremo 3' de la molécula de ácido nucleico.

40 En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de captura es capaz de hibridarse a ya sea la primera región de secuencia de ácido nucleico fija o una parte de la misma, o la segunda región de secuencia de ácido nucleico fija o una parte de la misma.

45 En determinadas realizaciones, el aparato comprende además un medio de detección para detectar la formación de un complejo que comprende el oligonucleótido de captura y la molécula de ácido nucleico.

En determinadas realizaciones, la molécula enlazadora es una molécula de ADN o ARN o una molécula mixta de ADN/ARN, en la que opcionalmente la molécula enlazadora comprende uno o más nucleótidos modificados.

50 En determinadas realizaciones, el aparato comprende un dispositivo de ensayo de flujo lateral. Acertadamente, la primera región comprende una región receptora de muestra. En determinadas realizaciones, el aparato comprende además una trayectoria de flujo entre la primera región y la región adicional.

55 En determinadas realizaciones, la trayectoria de flujo comprende una membrana, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa, de polietileno (PE), de politetrafluoroetileno (PTFE), de polipropileno (PP), de acetato de celulosa (CA), de poliácridonitrilo (PAN), de poliimida (PI), de polisulfona (PS), de polietersulfona (PES) o una membrana inorgánica que comprende óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ), óxido de silicio ( $SiO_2$ ) y/u óxido de ZIRCONIO ( $ZrO_2$ ).

60 En determinadas realizaciones, la primera región comprende una zona de aplicación de muestra, en la que opcionalmente la zona de aplicación de muestra comprende una almohadilla de aplicación de muestra. En determinadas realizaciones, el soporte de la primera región comprende una zona de inmovilización que comprende el oligonucleótido de inmovilización directa o indirectamente unido.

65 En determinadas realizaciones, la zona de inmovilización comprende fibras no tejidas, por ejemplo, fibras de celulosa, fibras de vidrio, fibras de carburo de silicio, fibras poliméricas, fibras animales (por ejemplo, lana, seda), fibras de carbono, fibras minerales y/o microfibras. En determinadas realizaciones, la zona de inmovilización comprende fibras tejidas.

En determinadas realizaciones, la primera región se proporciona corriente arriba de la región adicional. En determinadas realizaciones, la región adicional comprende una zona de captura en la que el oligonucleótido de captura está directa o indirectamente unido al soporte.

- 5 En determinadas realizaciones, la región adicional comprende una pluralidad de zonas de captura, comprendiendo cada zona de captura un oligonucleótido de captura directa o indirectamente unido al soporte, en la que cada oligonucleótido de captura puede ser el mismo o puede ser diferente.

- 10 En determinadas realizaciones, el aparato comprende además una zona de control localizada corriente abajo de la primera región, en el que la zona de control comprende un oligonucleótido de captura adicional. En determinadas realizaciones, el aparato comprende una pluralidad de zonas de control, comprendiendo cada zona de control un oligonucleótido de captura, en el que cada oligonucleótido de captura es el mismo o diferente.

- 15 Acertadamente, cada oligonucleótido de captura en las respectivas zonas de control está configurado para unirse a una molécula diferente.

- 20 En determinadas realizaciones, el aparato puede comprender una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, siendo cada molécula de ácido nucleico específica para una molécula diana diferente. En determinadas realizaciones, cada molécula de ácido nucleico comprende una o más, por ejemplo, 2 regiones de secuencia de ácido nucleico fijas que son la misma para más de una molécula de ácido nucleico. En determinadas realizaciones, cada molécula de ácido nucleico comprende la misma región(es) de secuencia de ácido nucleico fija que permite utilizar el mismo oligonucleótido de captura para capturar cada molécula de ácido nucleico sin importar la naturaleza de la molécula diana. Cada molécula de ácido nucleico puede comprender un medio de detección diferente para permitir detección separada y de modo que el aparato pueda ser adecuado para uso en un formato de ensayo múltiple.

- 25 En determinadas realizaciones, el aparato comprende además una cubierta que encierra la primera región y la región adicional. La cubierta puede comprender además un puerto de introducción de muestra.

- 30 En determinadas realizaciones, la cubierta comprende además una ventana adyacente a la zona de detección y opcionalmente a la zona de control. En determinadas realizaciones, el soporte de la primera región y/o la región adicional se selecciona independientemente de una perla, un microtítulo u otra placa de ensayo, una tira, una membrana, una película, un gel, un chip, una micropartícula, una nanopartícula, una nanofibra, un nanotubo, una micela, un microporo, un nanoporo y una superficie biosensora.

- 35 En determinadas realizaciones, la primera región está comprendida en un primer recipiente y la región adicional está comprendida en un recipiente adicional. Acertadamente, la fase sólida de la primera región y la región adicional están comprendidas en una tira. Acertadamente, la tira comprende además una trayectoria de flujo entre la primera región y la región adicional.

- 40 En determinadas realizaciones, el aparato comprende además uno o más de lo siguiente:

- 45 a) una almohadilla de absorbancia,  
b) una membrana, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa;  
c) una o más moléculas competidoras; y  
d) una o más moléculas de control.

- 50 En determinadas realizaciones, el aparato comprende además un recipiente configurado para acomodar al menos una porción del extremo de la tira y la muestra. En el recipiente comprende una región de introducción de muestra. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización y/o el oligonucleótido de captura se selecciona de una molécula de ADN, una molécula de ARN, una molécula mixta de ADN/ARN, una molécula de ADN modificada y una molécula de ARN modificada.

- 55 En determinadas realizaciones, el aparato comprende una pluralidad de oligonucleótidos de inmovilización, una pluralidad de oligonucleótidos de captura y una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

- En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un aptámero. Convenientemente, el aptámero se selecciona de un aptámero de doble hebra, un aptámero de hebra sencilla y un aptámero que es de doble hebra sobre al menos una porción de su longitud. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico y/o la molécula de inmovilización comprenden una etiqueta detectable.

- 60 En determinadas realizaciones, la etiqueta detectable se selecciona de un fluoróforo, una nanopartícula, un punto cuántico, una enzima, un isótopo radiactivo, una porción de secuencia predefinida, una biotina, una destiobiotina, un grupo tiol, un grupo amina, una azida, un grupo aminoalilo, una digoxigenina, un anticuerpo, un catalizador, una partícula metálica coloidal, una partícula coloidal no metálica, un polímero orgánico, una partícula de látex, una nanofibra, un nanotubo, un dendrímero, una proteína y un liposoma.

- 65 En determinadas realizaciones, la etiqueta detectable es una enzima, en la que opcionalmente la enzima se selecciona de peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, ureasa y  $\beta$ -galactosidasa.

En determinadas realizaciones, la muestra es una muestra biológica seleccionada de sangre total, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aliento, orina, semen, saliva, fluido meningeal, fluido amniótico, fluido glandular, fluido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, fluido sinovial, aspirado de articulación, células, un extracto celular, heces, tejido, una biopsia de tejido y líquido cefalorraquídeo.

En determinadas realizaciones, la muestra se deriva de un producto o subproducto agrícola o industrial, una muestra ambiental, agua, un producto alimenticio, una muestra de un proceso de producción, un producto animal, un producto vegetal y un producto bacteriano.

En determinadas realizaciones, la molécula diana se selecciona de una molécula pequeña orgánica o inorgánica, una célula, una proteína, un péptido, un aminoácido, un carbohidrato, un lípido, un virus, un microorganismo, una sección de tejido, un ion, un nucleótido, un derivado de nucleótido y un ácido nucleico.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia, ausencia o cantidad de una molécula diana en una muestra, el método comprende:

a) hacer interactuar una muestra con un complejo que comprende:

i) un oligonucleótido de inmovilización; y

ii) una molécula de ácido nucleico, en la que el oligonucleótido de inmovilización está unido directa o indirectamente a un soporte, comprendiendo el oligonucleótido de inmovilización una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico y en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse a una porción del oligonucleótido de inmovilización;

en la que la molécula de ácido nucleico tiene una afinidad de unión a una molécula diana, y además en la que la molécula de ácido nucleico está configurada para formar un complejo con la molécula diana;

b) si la molécula diana está presente en la muestra, disociar la molécula de ácido nucleico del complejo con el oligonucleótido de inmovilización para formar un complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico; y

c) proporcionar un oligonucleótido de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse a una porción del oligonucleótido de captura; y

d) detectar la presencia o ausencia de la molécula diana.

En determinadas realizaciones, el método comprende, además, si una molécula diana está presente en la muestra, formar un complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico-oligonucleótido de captura. En determinadas realizaciones, el método comprende además cuantificar la cantidad de molécula diana en la muestra.

En determinadas realizaciones, la detección de la molécula diana comprende detección fotónica, detección electrónica, detección acústica, detección electroquímica, detección electroóptica, detección enzimática, detección química, detección bioquímica o detección física.

En determinadas realizaciones, el paso (a) se realiza bajo condiciones eficaces para permitir la unión entre la molécula diana y la molécula de ácido nucleico. En determinadas realizaciones, el paso de detectar la presencia o ausencia de la molécula diana comprende detectar la hibridación de la molécula de ácido nucleico al oligonucleótido de captura.

En determinadas realizaciones, el método comprende interferometría de biocapa (BLI). En determinadas realizaciones, el método comprende un paso para determinar el desplazamiento de una molécula de ácido nucleico de un complejo molécula de ácido nucleico-oligonucleótido de inmovilización. En determinadas realizaciones, el método comprende además detectar hibridación de un complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana a un oligonucleótido de captura. En determinadas realizaciones, el método comprende incubar el complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana y oligonucleótido de captura inmovilizado durante al menos 2 minutos, por ejemplo, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos o más antes del paso de detectar la hibridación de un complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana al oligonucleótido de captura. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de captura se inmoviliza, por ejemplo, a una superficie de una sonda BLI.

En determinadas realizaciones, el método comprende resonancia de plasmón superficial (SPR). Determinadas realizaciones de la presente invención pueden proporcionar la ventaja de detección de moléculas pequeñas que normalmente no pueden detectarse. En particular, utilizando sistemas tales como BLI (que normalmente podría no ser lo suficientemente sensible para detectar), determinadas realizaciones de la presente invención involucran el desplazamiento de moléculas de ácido nucleico de un oligonucleótido de inmovilización que proporciona una señal mucho mayor que una señal generada por la unión a una pequeña molécula.

## Descripción Detallada De Determinadas Realizaciones De La Invención

## Descripción Breve De Las Figuras

Determinadas realizaciones de la presente invención se describirán con más detalle a continuación, con referencia a las figuras adjuntas en las que:

Figura 1 es una representación esquemática de una primera región de un aparato de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención;

Figura 2 es una representación esquemática de un aparato de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención;

Figura 3 es una representación esquemática de una molécula de ácido nucleico para uso en el aparato y métodos de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención. En particular, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una 'secuencia de captura' fija (barra negra) que es complementaria a un oligonucleótido de inmovilización y/o una secuencia de "oligonucleótido de captura". Estas secuencias se utilizan para inmovilizar la molécula de ácido nucleico, ya sea sola o en complejo con una molécula diana, y/o para hibridar con el oligonucleótido de captura en el evento de "recaptura".

En determinadas realizaciones, el 'oligonucleótido de inmovilización' tiene un enlazador (línea punteada) para reducir impedimento estérico del primer y/o soporte adicional. Acertadamente, la molécula de ácido nucleico también comprende 2 'secuencias cebadoras' fijas (barras negras) que se utilizan para amplificar la biblioteca mediante PCR, etc. Una (o ambas) de estas regiones cebadoras se puede modificar con un fluoróforo (círculo) u otra fracción funcional (nanopartícula, punto cuántico, enzima, etc.) para permitir la detección de la molécula de ácido nucleico según se requiera en el ensayo. Las regiones cebadoras también se pueden utilizar como "regiones de captura" para hibridar con el oligonucleótido de captura en el evento de "recaptura".

Figura 4 es una representación esquemática de un aparato y método de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención en la que se realiza un ensayo ELONA.

Figura 5 es una gráfica que ilustra curvas de respuesta de interferometría de biocapa en diferentes pasos del ensayo de desplazamiento del aptámero de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención. Se inmovilizó un primer aptámero sobre la sonda recubierta con estreptavidina mediante un oligonucleótido de inmovilización complementario biotinilado. Después de varios pasos de lavado, la sonda se incubó con la molécula diana. La unión a la diana ocasiona un desplazamiento del aptámero visto como una señal de 'disociación'.

Figura 6 proporciona datos que muestran curvas de respuesta de interferometría de biocapa en diferentes pasos del método de ensayo de recaptura del aptámero. En primer lugar, los oligonucleótidos de captura biotinilados revFOR (verde) y REV (rosa) se inmovilizaron en las sondas recubiertas con estreptavidina, respectivamente. Después de varios pasos de lavado, las sondas se incubaron con los complejos aptámero-diana obtenidos del ensayo de desplazamiento del aptámero en la Figura 5. La recaptura del aptámero se observa como una señal creciente a medida que el complejo aptámero-diana se une al oligonucleótido de captura inmovilizado. La Figura 6 indica que se puede utilizar cualquiera de las regiones cebadoras fijas para recapturar el complejo aptámero-molécula diana.

Figura 7 A a D muestra ensayos tipo ELISA que demuestran una recaptura dependiente de la concentración. Cada uno de los paneles A a D muestra fluorescencia de los aptámeros recapturados (etiquetados con FAM) (eje-y), frente a la cantidad de aptámero de entrada (eje-x) incubado con una placa preinmovilizada con 'oligo de captura'. Cuando no está presente ningún 'oligo de captura' ('0', línea punteada), no se recaptura ningún aptámero. A medida que se aumenta la cantidad de 'oligo de captura', se recaptura más aptámero y se obtiene más fluorescencia. La pre inmovilización de la placa ELISA con 'oligo de captura' biotinilado permite la recaptura de aptámeros de una manera dependiente de la concentración. Los aptámeros pueden ser recapturados por cualquiera de los extremos 5' o 3' (delantero y reverso en las gráficas A y C, y B y D respectivamente). Los datos también muestran que los aptámeros se pueden recapturar a cualquiera de los pH del amortiguador común utilizado en los ensayos de desplazamiento; pH 6.8 (A y B) y pH 7.4 (C y D).

Figura 8 A a D también muestran ensayos tipo ELISA que demuestran una recaptura dependiente de la concentración. Cada uno de los paneles A a D muestra fluorescencia de los aptámeros recapturados (etiquetados con FAM) (eje-y), frente a la cantidad de 'oligo de captura' incubada con la placa (eje-x). Cada serie (círculos, rombos, triángulos y cuadrados) es una cantidad diferente de aptámero etiquetado con fluorescencia (50, 10, 2, 0 pmol de aptámero respectivamente). En la cantidad más alta de aptámero (50 pmol, círculos) se puede observar una tendencia clara en cada uno de los amortiguadores y con ambos 'oligos de captura'. Esto demuestra que cualquier 'extremo' del aptámero (5' en A y C o 3' en B y D) se puede utilizar para recapturar, y que el pH del amortiguador no tiene un impacto significativo en la unión. La recaptura dependiente de la concentración se observa con una cantidad creciente de oligo de captura biotinilado pre inmovilizado en la placa. La saturación se alcanza cuando la cantidad de aptámero alcanza la misma cantidad que el oligo de captura biotinilado pre inmovilizado.

Figura 9 A a D muestra los resultados de un ensayo tipo ELONA. Ilustra señales de fluorescencia medidas que representan la cantidad de un aptámero desplazado de una superficie al unirse a una molécula pequeña diana, en 4 concentraciones diferentes de sustratos/matrices de prueba (plasma humano, leche, agua de río y orina simulada, a concentraciones de 0%, 10%, 25%, 40% v/v, respectivamente). Los datos se graficaron después de corregirlos

restando la fluorescencia de los pocillos de control de '0  $\mu$ M de molécula diana'. Se observa una unión dependiente de la concentración entre la molécula diana y el aptámero a 4 concentraciones diferentes de sustratos/matrices probadas;

Figura 10 A a D ilustra señales de fluorescencia medidas que representan la cantidad de aptámero fluorescente recapturado por el 'oligonucleótido de captura' inmovilizado (forREV) a 4 concentraciones diferentes de sustratos/matrices de prueba (plasma humano, leche, agua de río y orina simulada, a concentraciones de 0%, 10%, 25%, 40% v/v, respectivamente). Las gráficas muestran datos crudos de mediciones de fluorescencia; y

Figuras 11 A y B muestra los resultados de los ensayos combinados de desplazamiento y recaptura en un solo ensayo. Los aptámeros se desplazaron de la primera placa (A) y luego se recapturaron en la segunda placa (B) pre inmovilizada con 'oligo de captura' biotinilado. El mismo aptámero y diana se probaron en una variedad de matrices comunes (plasma, agua de río, leche y orina), demostrando la versatilidad de esta plataforma.

## Descripción Detallada

A continuación, se describen características adicionales de determinadas realizaciones de la presente invención.

La práctica de las realizaciones de la presente invención va a emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la habilidad de aquellos trabajan en la técnica.

La biología molecular más general, tecnología de ADN recombinante microbiológica y técnicas inmunológicas se pueden encontrar en Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2001) Cold Harbor-Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. o Ausubel et al., Current protocols in molecular biology (1990) John Wiley and Sons, N.Y. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente alguien con habilidades ordinarias en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2<sup>nd</sup> ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> ed., Academic Press; y el Oxford University Press, proporcionan a una persona experta en la técnica con un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

Las unidades, prefijos y símbolos se indican en la forma aceptada en el Système International de Unitese (SI). Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxilo y las secuencias de ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'.

A continuación, la invención se explicará con más detalle mediante ejemplos no limitantes de realizaciones específicas. En los experimentos de ejemplo, se utilizan reactivos estándar y amortiguadores libres de contaminación.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato para detectar la presencia, ausencia o nivel de una molécula diana en una muestra, el aparato comprende:

a) una primera región que comprende:

- i) un soporte; y
- ii) un oligonucleótido de inmovilización; y
- iii) una molécula de ácido nucleico que tiene una afinidad de unión a una molécula diana, en la que la molécula de ácido nucleico está configurada para formar un complejo con la molécula diana,

en la que el oligonucleótido de inmovilización está unido directa o indirectamente al soporte, y además en la que el oligonucleótido de inmovilización comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico y en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse al oligonucleótido de inmovilización y además en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de ser desplazada del complejo con el oligonucleótido de inmovilización si la molécula diana está presente en la muestra; el aparato comprende además:

b) una región adicional que comprende:

- i) un soporte; y
- ii) un oligonucleótido de captura unido directa o indirectamente al soporte, en el que el oligonucleótido de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, en el que el oligonucleótido de captura está configurado para hibridarse a la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico cuando está en complejo con la molécula diana para capturar el complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana permitiendo así detectar la presencia o el nivel de la molécula diana.



En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia, ausencia o cantidad de una molécula diana en una muestra, el método comprende:

a) hacer interactuar una muestra con un complejo que comprende:

5

i) un oligonucleótido de inmovilización; y

ii) una molécula de ácido nucleico, en la que el oligonucleótido de inmovilización está unido directa o indirectamente a un soporte, comprendiendo el oligonucleótido de inmovilización una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico y en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse a una porción del oligonucleótido de inmovilización;

10

en la que la molécula de ácido nucleico tiene una afinidad de unión a una molécula diana, y además en la que la molécula de ácido nucleico está configurada para formar un complejo con la molécula diana;

15

b) si la molécula diana está presente en la muestra, disociar la molécula de ácido nucleico del complejo con el oligonucleótido de inmovilización para formar un complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico; y

c) proporcionar un oligonucleótido de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse a una porción del oligonucleótido de captura; y

20

d) detectar la presencia o ausencia de la molécula diana.

En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la molécula de ácido nucleico hibridada con una molécula diana. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la molécula de ácido nucleico y el oligonucleótido de inmovilización con una muestra que comprende una molécula diana.

25

Cuando la molécula de ácido nucleico se pone en contacto con una molécula diana, se forma un complejo molécula de ácido nucleico-diana uniendo la molécula de ácido nucleico a la molécula diana. El evento de unión da como resultado desestabilización e interrupción de la hibridación descrita anteriormente. En consecuencia, la molécula de ácido nucleico es desplazada del oligonucleótido de inmovilización.

30

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se inmoviliza en una superficie mediante hibridación con el oligonucleótido de inmovilización. La unión de la molécula diana ocasiona un cambio conformacional en la molécula de ácido nucleico que resulta en su desplazamiento del oligonucleótido de inmovilización y, como resultado, desplazamiento de la superficie.

35

Las realizaciones de la presente invención se refieren al aparato y métodos para detectar la presencia y/o ausencia de una molécula diana en una muestra utilizando una molécula de ácido nucleico. Como se utiliza en la presente, "molécula de ácido nucleico" y "aptámero" se utilizan indistintamente para referirse a una molécula de ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una molécula diana. Para aptámeros de ácidos nucleicos, por ejemplo, se distingue entre aptámeros de ADN formados a partir de ADN de cadena sencilla (ADNss) y aptámeros de ARN formados a partir de ARN de cadena sencilla (ARNss). Los aptámeros pueden mostrar una alta propiedad de unión a la molécula diana y la afinidad de los mismos suele ser alta en comparación con anticuerpos que tienen una función similar. Los aptámeros se caracterizan por la formación de una estructura tridimensional específica que depende de la secuencia de ácido nucleico. La estructura tridimensional de un aptámero surge debido al apareamiento de bases intramoleculares de Watson y Crick, apareamiento de bases de Hoogsteen (cuádruplex), formación de pares por bamboleo u otras interacciones de bases no canónicas. Esta estructura permite que los aptámeros, análogos a la unión antígeno-anticuerpo, se unan a estructuras diana con precisión. Una secuencia de ácido nucleico particular de un aptámero puede, bajo condiciones definidas, tener una estructura tridimensional que es específica de una estructura diana definida.

40

Los aptámeros de ácido nucleico descritos en la presente pueden comprender nucleótidos y/o derivados de bases naturales o no naturales (o combinaciones de los mismos). En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una o más modificaciones de modo que comprende una estructura química distinta que desoxirribosa, ribosa, fosfato, adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) o uracilo (U). La molécula de ácido nucleico puede modificarse en la nucleobase, en la pentosa o en el esqueleto de fosfato.

45

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende uno o más nucleótidos modificados. Modificaciones ejemplares incluyen, por ejemplo, nucleótidos que comprenden una alquilación, arilación o acetilación, alcoxilación, halogenación, grupo amino u otro grupo funcional. Ejemplos de nucleótidos modificados incluyen 2'-fluoro ribonucleótidos, 2'-NH<sub>2</sub>, 2'-OCH<sub>3</sub>- y 2'-O-metoxietil ribonucleótidos, que se utilizan para aptámeros de ARN.

50

La molécula de ácido nucleico puede ser total o parcialmente fosforotioato o ADN, fosforoditioato o ADN, fosforoselenoato o ADN, fosforodiselenoato o ADN, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA), ARN/ADN N3'-P5' 'fosforamidato, ácido nucleico ciclohexeno (CeNA), ADN triciclo (ADNtc) o spiegelmer, o los componentes de morfina fosforamidato (PMO) (véase también Chan et al., Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (2006) 33, 533-540).

55

60

65

Algunas de las modificaciones permiten estabilizar las moléculas de ácido nucleico frente a enzimas que escinden ácido nucleico. En la estabilización de los aptámeros generalmente se puede hacer una distinción entre la modificación subsecuente de los aptámeros y la selección con ARN/ADN ya modificado. La estabilización no afecta la afinidad de los aptámeros de ARN/ADN modificados, pero previene la rápida descomposición de los aptámeros en un organismo o en soluciones biológicas mediante RNasas/DNasas. Un aptámero se denomina como estabilizado en el contexto de la presente invención si la vida media en suero biológico es superior a un minuto, preferiblemente superior a una hora, más preferiblemente superior a un día. Los aptámeros también pueden modificarse con moléculas reporteras que, además de la detección de los aptámeros etiquetados, también pueden contribuir a aumentar la estabilidad.

Una acción deseable incluye, por ejemplo, unión de la molécula diana, cambiar catalíticamente a la molécula diana, reacción con la molécula diana en una manera que modifica o altera la diana o la actividad funcional de la molécula diana, unión covalente a la molécula diana y facilitar la reacción entre la molécula diana y otra molécula. En el contexto de realizaciones de la presente invención, una acción deseable es la unión de una molécula diana con una alta afinidad.

En una realización, la acción es afinidad de unión específica por una molécula diana, en la que la molécula diana es una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido que se une al ligando de ácido nucleico a través de un mecanismo que es independiente al apareamiento de bases de Watson/Crick o la formación de hélice triple, en la que el aptámero no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de estar unido a la molécula diana.

Los aptámeros para una molécula diana se pueden seleccionar utilizando procesos conocidos. Por ejemplo, se puede preparar un aptámero utilizando el método SELEX y un método mejorado del mismo (por ejemplo, Ellington & Szostak, (1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk & Gold, (1990) Science, 249, 505-510). En el método SELEX, al establecer condiciones de selección estrictas al aumentar el número de rondas o utilizando una sustancia competidora, se concentra y selecciona un aptámero que exhibe un potencial de unión más fuerte para la molécula diana. Por lo tanto, al ajustar el número de rondas de SELEX y/o cambiar la condición competitiva, en algunos casos se pueden obtener aptámeros con diferentes fuerzas de unión, aptámeros con diferentes formas de unión y aptámeros con la misma fuerza de unión o modo de unión, pero diferentes secuencias de bases. El método SELEX comprende un proceso de amplificación por PCR; al ocasionar una mutación mediante el uso de iones de manganeso y similares en el proceso, es posible realizar SELEX con mayor diversidad.

La variabilidad de una biblioteca está, por ejemplo, en el intervalo de alrededor de  $10^{15}$  moléculas diferentes. A partir de la biblioteca de moléculas de ácido nucleico de ADN de cadena sencilla o ARN, las moléculas de ácido nucleico que se unen mejor a la diana se enriquecen ciclo tras ciclo mediante diversos pasos de selección y amplificación. Cada ciclo de selección de aptámeros comprende esencialmente los siguientes sub pasos:

- a) unión de la biblioteca de moléculas de ácido nucleico a la diana;
- b) separar moléculas de ácido nucleico unidas a la diana de las no unidas;
- c) recuperación de moléculas de ácido nucleico unidas a la diana;
- d) amplificación de moléculas de ácido nucleico recuperadas (por ejemplo, PCR para moléculas de ADN, PCR con transcripción reversa para moléculas de ARN); y
- e) preparación de ácidos nucleicos de cadena sencilla relevantes a partir del producto amplificado (por ejemplo, purificación de ADNss, transcripción de ARN in vitro).

Después de cada ciclo, el conjunto de moléculas de ácido nucleico seleccionado y enriquecido se utiliza como el material de partida para el siguiente ciclo. Normalmente, se corren 8 a 12 ciclos, aunque este número varía dependiendo del tipo de diana, método y eficiencia de selección.

En determinadas realizaciones, el método comprende analizar la secuencia de ácido nucleico de un aptámero que se ha identificado como de unión a la molécula diana con alta afinidad de unión. Después de analizar la secuencia, los aptámeros (incluyendo variantes, mutantes, fragmentos y derivados de los mismos) se pueden preparar mediante técnicas convencionales de síntesis química de ADN y ARN, que son conocidas por el experto en la técnica. Además, se pueden investigar las propiedades de unión de aptámeros individuales a la molécula diana.

En determinadas realizaciones, la al menos una región aleatorizada está flanqueada en los extremos 5' y 3' por regiones cebadoras. Las regiones cebadoras sirven como sitios de unión del cebador para la amplificación por PCR de la biblioteca y los aptámeros seleccionados.

En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que se utilizan en el aparato y los métodos se seleccionan de una "biblioteca de selección de aptámeros universal" que está diseñada de tal manera que cualquier aptámero que provenga de este proceso de selección necesite poca o ninguna adaptación para convertirse en cualquiera de los formatos de ensayo enlistados. En determinadas realizaciones, la "biblioteca de selección de aptámeros universal" consta de las siguientes partes funcionales: secuencia cebadora 5', al menos una región de hibridación/captura (complementaria a un "oligonucleótido de inmovilización"), al menos una región aleatorizada y una secuencia cebadora 3'. Una vez seleccionada, la molécula de ácido nucleico puede modificarse adicionalmente, por ejemplo, para eliminar una o ambas secuencias cebadoras antes de utilizarse. En determinadas realizaciones y como se describió anteriormente, las secuencias cebadoras fijas se pueden utilizar como secuencia de captura. Por lo tanto,

en determinadas realizaciones, el oligonucleótido de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una de las secuencias cebadoras en la molécula de ácido nucleico. Esto permite el desarrollo de métodos y de aparato que utilizan un oligonucleótido de captura que comprende la misma secuencia de ácido nucleico sin importar la molécula diana que va ser detectada.

Los aptámeros se alteran fácilmente ya que permiten la síntesis química. Para los aptámeros, al predecir la estructura secundaria utilizando el programa MFOLD, o al predecir la estructura estérica mediante análisis de rayos X o análisis de RMN, es posible predecir hasta cierto punto qué nucleótido se puede sustituir o eliminar, dónde insertar un nuevo nucleótido y similares. Un aptámero predicho con la nueva secuencia se puede sintetizar químicamente fácilmente y se puede determinar si el aptámero conserva o no la actividad utilizando un sistema de ensayo existente.

Los aptámeros para uso en el aparato y métodos de determinadas realizaciones de la presente invención se pueden sintetizar mediante métodos conocidos per se en la técnica. Uno de los métodos de síntesis es un método que utiliza una ARN polimerasa. El ARN objetivo se puede obtener sintetizando químicamente un ADN que tiene la secuencia objetivo y una secuencia promotora de ARN polimerasa, seguido de transcripción in vitro utilizando el mismo como templado y de acuerdo con un método ya conocido.

Se puede sintetizar utilizando ADN polimerasa. El ADN que tiene una secuencia objetivo se sintetiza químicamente y, utilizando el mismo como templado, se realiza la amplificación mediante un método conocido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Éste se convierte en una sola hebra mediante un método ya conocido de electroforesis con poliacrilamida o método de tratamiento enzimático. Cuando se sintetiza un aptámero modificado, la eficacia de la reacción de elongación se puede aumentar utilizando una polimerasa introducida con una mutación en un sitio específico. El aptámero así obtenido puede ser purificado fácilmente mediante un método conocido.

Los aptámeros se pueden sintetizar en grandes cantidades mediante un método de síntesis química como el método de amidita, método de fosoramidita y similares. El método de síntesis es un método bien conocido, y como se describe en Nucleic Acid (Vol. 2)[1] Synthesis and Analysis of Nucleic Acid (Editor: Yukio Sugiura, Hirokawa Publishing Company) y similares. De hecho, se utiliza un sintetizador como OligoPilot100, OligoProcess y similares fabricados por GE Healthcare Bioscience. La purificación se realiza mediante un método conocido per se como cromatografía y similares.

### **Molécula Diana**

El aparato y métodos descritos en la presente se utilizan para detectar la presencia o ausencia y/o cuantificar la cantidad de una molécula diana en una muestra. El término "molécula diana", como se utiliza en la presente, denota una molécula que se puede encontrar en una muestra analizada y que es capaz de unirse a una molécula de ácido nucleico descrita en la presente.

De acuerdo con algunas realizaciones, la molécula diana es una molécula orgánica. En algunas realizaciones, la molécula diana es un antígeno soluble, un antígeno de superficie celular o un antígeno asociado con una micela, un liposoma o una partícula. En una realización, la molécula diana es un antígeno.

En algunas realizaciones, la molécula diana puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido, un gangliósido, un lípido, un fosfolípido, un carbohidrato, una molécula pequeña o una molécula de ácido nucleico.

En determinadas realizaciones, un antígeno soluble puede ser una proteína, un péptido, una enzima, una citoquina, un marcador de cáncer soluble, un marcador asociado a la inflamación, una hormona y/o una molécula soluble derivada de un virus, bacteria o un hongo para, por ejemplo, una toxina o un alérgeno.

En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno asociado a un microorganismo. Tal como se utiliza en la presente, el término "antígeno asociado a un microorganismo" debe entenderse como una proteína o fragmento de la misma codificada por el genoma viral, bacteriano o fúngico.

En determinadas realizaciones, el antígeno es un marcador de cáncer (o tumoral). En general, se puede encontrar un marcador tumoral en los fluidos corporales, como en sangre u orina, o en tejidos corporales. Los marcadores tumorales se pueden expresar o sobreexpresar en cáncer y generalmente son indicativos de un proceso patológico particular.

Ejemplos no limitantes de un antígeno de superficie celular de acuerdo con la invención son un receptor, un marcador de superficie celular, un antígeno asociado a un microorganismo o un ligando de receptor.

En determinadas realizaciones, la molécula diana es una molécula pequeña. En determinadas realizaciones, la molécula pequeña es un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico que se utiliza en el tratamiento del cáncer.

### **Muestra**

La molécula diana puede estar comprendida en una muestra. La muestra puede comprender sangre total, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aliento, orina, semen, saliva, fluido meningeal,

fluido amniótico, fluido glandular, fluido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, fluido sinovial, aspirado de articulación, células, un extracto celular, heces, tejido, una biopsia de tejido y líquido cefalorraquídeo.

5 La muestra puede comprender sangre, suero, fluido intersticial, fluido espinal, fluido cerebral, exudados de tejido, muestras de tejido maceradas, soluciones celulares, compartimentos intracelulares, agua subterránea u otras muestras biológicas y ambientales. Las muestras pueden estar inalteradas o pueden estar pre tratadas antes del análisis, por ejemplo, siendo filtradas, diluidas, concentradas, amortiguadas o tratadas de otro modo.

10 Una muestra es adecuadamente un material proporcionado o muestreado que se cree que contiene una o más moléculas diana de interés, por ejemplo, un pequeño analito(s) molecular de interés) y que debe revisarse para la presencia de la diana.

15 La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra clínica, una muestra de alimento, una muestra de agua o una muestra de otro material ambiental muestreado. En determinadas realizaciones, la muestra comprende una molécula diana y una solución amortiguadora. En determinadas realizaciones, la muestra se pre trata, tal como mediante mezcla, adición de enzimas o marcadores, o se purifica.

20 En determinadas realizaciones, la muestra puede además ser cualquier material biológico aislado de individuos, por ejemplo, tejidos y fluidos biológicos, que incluyen, pero no se limitan a: recuento de sangre, piel, plasma, suero, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, hisopados, muestras de tejido, órganos y tumores. En determinadas realizaciones, también se incluyen en las muestras componentes de cultivos celulares.

En la presente se describen otras moléculas diana y muestras ejemplares.

## 25 **Oligonucleótido De Inmovilización**

Acertadamente, el oligonucleótido de inmovilización comprende una secuencia de ácido nucleico que está configurada para hibridarse a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico sobre al menos una porción de su longitud.

30 En determinadas realizaciones, la región de inmovilización de la molécula de ácido nucleico se hibrida sobre al menos una porción de la misma a una región del oligonucleótido de inmovilización. Los términos "hibrida" e "hibridación" como se utilizan en la presente se refieren a formar una interacción basada en apareamiento de bases de Watson-Crick entre una región fija dentro de la biblioteca de aptámeros y una secuencia complementaria dentro del 'oligonucleótido de inmovilización', bajo condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente bajo condiciones estrictas, como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3. Ed. (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

40 El oligonucleótido de inmovilización o porción del mismo está configurado para formar una estructura dúplex de doble hebra con la región de inmovilización o una porción de la misma de la molécula de ácido nucleico. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización está entre aproximadamente 10 nucleótidos y alrededor de 20 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud. El oligonucleótido de inmovilización puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia fija de la molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización puede ser un oligonucleótido "universal" en el sentido de que puede configurarse para hibridarse a una secuencia que puede incluirse en una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. En la Figura 3 se proporciona una representación esquemática.

50 En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico y el oligonucleótido de inmovilización se incuban bajo condiciones suficientes para que la molécula de ácido nucleico o porción de la misma se hibride al oligonucleótido de inmovilización.

55 Un experto en la técnica entenderá que las condiciones requeridas para que se produzca hibridación van a variar entre reacciones. En determinadas realizaciones, el método comprende calentar una mezcla de la molécula de ácido nucleico y el oligonucleótido de inmovilización, por ejemplo, hasta al menos alrededor de 80°C, por ejemplo, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C o 90°C durante al menos alrededor de 1 minuto, por ejemplo, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos o más. El método puede comprender además enfriar la molécula de ácido nucleico y el oligonucleótido de inmovilización a una temperatura inferior a alrededor de 10°C, por ejemplo, 9°C, 8°C, 7°C, 6°C, 5°C, 4°C o menos.

60 En determinadas realizaciones, la hibridación se lleva a cabo antes de la inmovilización del oligonucleótido de inmovilización en el soporte. En una realización alternativa, el oligonucleótido de inmovilización se une al soporte antes de la hibridación de la molécula de ácido nucleico al oligonucleótido de inmovilización.

65 El oligonucleótido de inmovilización está unido al soporte de la primera región. La unión puede ser directa o indirecta, por ejemplo, a través de un enlazador u otra fracción de unión.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización comprende una porción enlazadora. La porción enlazadora puede seleccionarse de biotina, tiol y amina. El oligonucleótido de inmovilización puede comprender además una molécula espaciadora, por ejemplo, una molécula espaciadora seleccionada de una molécula de polinucleótido, una molécula espaciadora C6, una molécula espaciadora C12, otra molécula espaciadora de longitud C, una molécula de hexaetilenglicol, un hexanodiol y/o un polietilenglicol.

El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de biotina. En determinadas realizaciones, el aptámero puede conjugarse con avidina. Detalles adicionales sobre los enlazadores se encuentran en la presente. En determinadas realizaciones, el enlazador y/o la molécula espaciadora es una molécula fotoescindible, por ejemplo, 5-bromouracilo y/o 5-yodouracilo.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización se puede modificar para unirse a la superficie de soporte. Por ejemplo, el oligonucleótido de inmovilización puede unirse mediante un enlace silano. Alternativamente, o, además, el oligonucleótido de inmovilización puede estar succinilado (por ejemplo, para unir el oligonucleótido de inmovilización a vidrio derivatizado con aminofenilo o aminopropilo). Acertadamente, el soporte está derivatizado con aminofenilo o aminopropilo. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización comprende una modificación a  $\text{NH}_2$  (por ejemplo, para unir el oligonucleótido a un vidrio recubierto con epoxi silano o isotiocianato). Acertadamente, la superficie del soporte está revestida con un epoxi silano o isotiocianato. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización se modifica con hidrazida para poder unirse a una molécula de aldehído o epóxido.

### Soporte

El aparato de determinadas realizaciones comprende una primera región que comprende un soporte. El soporte puede comprender un soporte en estado sólido como una membrana o una perla. El soporte puede ser un soporte bidimensional, por ejemplo, una microplaca o un soporte tridimensional, por ejemplo, una perla. Por lo tanto, en determinadas realizaciones el soporte puede comprender al menos una perla magnética. En realizaciones alternativas, el soporte puede comprender al menos una nanopartícula, por ejemplo, nanopartículas de oro o similares. En aún realizaciones adicionales, el soporte de la primera región comprende una placa de microtitulación u de otro ensayo, una tira, una membrana, una película, un gel, un chip, una micropartícula, una nanofibra, un nanotubo, una micela, un microporo, un nanoporo y una superficie biosensora. En determinadas realizaciones, la superficie biosensora puede ser una superficie de punta de sonda, un canal de flujo de biosensor o similar. En determinadas realizaciones, la región adicional comprende un soporte. Los soportes de la primera y las regiones adicionales pueden ser un elemento continuo. Alternativamente, los soportes de la primera y las regiones adicionales pueden ser elementos separados.

Materiales particularmente adecuados a partir de los cuales se puede fabricar un soporte incluyen, por ejemplo, polímeros inorgánicos, polímeros orgánicos, vidrios, cristales orgánicos e inorgánicos, minerales, óxidos, cerámicas, metales, especialmente metales preciosos, carbono y semiconductores. Un polímero orgánico particularmente adecuado es un polímero basado en poliestireno. Biopolímeros, tales como celulosa, dextrano, agar, agarosa y Sephadex, que pueden estar funcionalizados, en particular como nitrocelulosa o bromuro de cianógeno Sephadex, se pueden utilizar como polímeros que proporcionan un soporte sólido.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización puede estar unido, directa o indirectamente, a una perla magnética, que puede ser, por ejemplo, terminación carboxilo, modificada con avidina o activada con epoxi o modificada de otro modo con un grupo reactivo compatible. Los ejemplos de polímeros no son limitantes y otras moléculas son concebibles.

La inmovilización de oligonucleótidos a un soporte, por ejemplo, un soporte de fase sólida se puede lograr de diversas formas y de cualquier manera conocida por los expertos en la técnica para inmovilizar ADN o ARN en sólidos. La inmovilización de aptámeros en nanopartículas es, por ejemplo, como se describe en WO2005/13817. Por ejemplo, se puede humedecer una fase sólida de papel o un material poroso con el aptámero en fase líquida y volatilizar posteriormente la fase líquida dejando el aptámero en el papel o material poroso.

En determinadas realizaciones, el soporte de la primera y/o región adicional comprende una membrana, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa, de polietileno (PE), de politetrafluoroetileno (PTFE), de polipropileno (PP), de acetato de celulosa (CA), de poliacrilonitrilo (PAN), de poliimida (PI), de polisulfona (PS), de polietersulfona (PES) o una membrana inorgánica que comprende óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) y/u óxido de ZIRCONIO ( $\text{ZrO}_2$ ).

Materiales particularmente adecuados a partir de los cuales se puede fabricar un soporte incluyen, por ejemplo, polímeros inorgánicos, polímeros orgánicos, vidrios, cristales orgánicos e inorgánicos, minerales, óxidos, cerámicas, metales, especialmente metales preciosos, carbono y semiconductores. Un polímero orgánico particularmente adecuado es un polímero basado en poliestireno. Biopolímeros, tales como celulosa, dextrano, agar, agarosa y Sephadex, que pueden estar funcionalizados, en particular como nitrocelulosa o bromuro de cianógeno Sephadex, se pueden utilizar como polímeros que proporcionan un soporte sólido.

### Región Adicional

El aparato también comprende una región adicional que comprende un soporte. El soporte de la región adicional puede ser el mismo o puede ser diferente al soporte de la primera región. La región adicional puede estar comprendida en un recipiente o aparato diferente al de la primera región.

La región adicional también incluye un oligonucleótido de captura directa o indirectamente unido al soporte adicional. El oligonucleótido de captura puede comprender la misma secuencia que el oligonucleótido de inmovilización. Alternativamente, el oligonucleótido de captura puede comprender una secuencia diferente a la del oligonucleótido de inmovilización. La región adicional puede comprender una pluralidad de oligonucleótidos de captura que se unen a la molécula de ácido nucleico en una secuencia diferente de la misma.

El oligonucleótido de captura o porción del mismo está configurado para formar una estructura dúplex de doble hebra con una secuencia de la molécula de ácido nucleico. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de captura tiene una longitud de entre aproximadamente 10 nucleótidos y alrededor de 20 nucleótidos, por ejemplo 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud. El oligonucleótido de captura puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia fija de la molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización puede ser un oligonucleótido "universal" dado que se puede configurar para hibridarse a una secuencia que puede incluirse en una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

### Etiquetas Detectables

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una etiqueta detectable. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de captura comprende una molécula detectable. En determinadas realizaciones, la etiqueta detectable es una fracción fluorescente, por ejemplo, un compuesto fluorescente/extintor. Los compuestos fluorescentes/extintores son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mary Katherine Johansson, *Methods in Molecular Biol.* 335: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols, 2006, Didenko, ed., Humana Press, Totowa, NJ, y Marras et al., 2002, *Nucl. Acids Res.* 30, e122.

Adicionalmente, las fracciones que resultan en un aumento en la señal detectable cuando están próximas entre sí se pueden utilizar como etiquetas alternativas en el aparato y los métodos descritos en la presente, por ejemplo, como resultado de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("FRET"); los pares adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y tetrametilrodamina; rodamina 6G y verde de malaquita, y FITC y tiosemicarbazol, por nombrar a algunos.

En determinadas realizaciones, la etiqueta detectable se selecciona de un fluoróforo, una nanopartícula, un punto cuántico, una enzima, un isótopo radiactivo, una porción de secuencia predefinida, una biotina, una destiobiotina, un grupo tiol, un grupo amina, una azida, un grupo aminoalilo, una digoxigenina, un anticuerpo, un catalizador, una partícula metálica coloidal, una partícula coloidal no metálica, un polímero orgánico, una partícula de látex, una nanofibra, un nanotubo, un dendrímero, una proteína y un liposoma.

En determinadas realizaciones, la etiqueta detectable es una enzima, en la que opcionalmente la enzima se selecciona de peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, ureasa y  $\beta$ -galactosidasa.

En determinadas realizaciones, la naturaleza de los medios de detección dependerá de la etiqueta detectable utilizada. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la etiqueta puede ser detectable en virtud de su color, por ejemplo, nanopartículas de oro. Un color se puede detectar cuantitativamente mediante un lector óptico o una cámara, por ejemplo, una cámara con software de imagenología. En determinadas realizaciones, si la etiqueta detectable es una etiqueta fluorescente, por ejemplo, un punto cuántico, los medios de detección pueden comprender un lector de tira fluorescente que está configurado para registrar intensidad de fluorescencia, por ejemplo.

En realizaciones en las que la etiqueta detectable es una etiqueta enzimática, el medio de detección puede ser un detector electroquímico. La etiqueta de detección puede comprender además enzimas tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (APP) o similares, para rotar catalíticamente un sustrato para dar una señal amplificada.

En determinadas realizaciones, el método comprende detectar la formación del complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana. Como se discute en la presente, cuando el aptámero se pone en contacto con la diana, se forma un complejo aptámero-diana al unir el aptámero a la diana. La unión o el evento de unión se puede detectar, por ejemplo, visualmente, ópticamente, fotónicamente, electrónicamente, acústicamente, optoacústicamente, por masa, electroquímicamente, electroópticamente, espectrométricamente, enzimáticamente o de otro modo químicamente, bioquímicamente o físicamente.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender una molécula de detección, por ejemplo, una etiqueta. Las etiquetas ejemplares son visuales, ópticas, fotónicas, electrónicas, acústicas, optoacústicas, de masa, electroquímicas, electroópticas, espectrométricas, enzimáticas o detectables de otro modo físicamente, químicamente o bioquímicamente. En una realización del método, la etiqueta se detecta mediante luminiscencia, espectroscopia UV/VIS, enzimáticamente, electroquímicamente o radiactivamente. La luminiscencia se refiere a la emisión de luz. En el método de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, se utilizan, por ejemplo, fotoluminiscencia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia para detección de la etiqueta. En fotoluminiscencia

o fluorescencia, la excitación se produce por absorción de fotones. Los fluoróforos ejemplares incluyen, sin limitación, bisbenzimidazol, fluoresceína, naranja de acridina, Cy5, Cy3 o yoduro de propidio, que pueden acoplarse covalentemente a aptámeros, tetrametil-6-carboxidodamina (TAMRA), rojo Texas (TR), rodamina, colorantes Alexa flúor (et al. colorantes fluorescentes de diferentes longitudes de onda de diferentes empresas).

Otras etiquetas son catalizadores, partículas metálicas coloidales, por ejemplo, como nanopartículas de oro, partículas coloidales no metálicas, puntos cuánticos, polímeros orgánicos, partículas de látex, nanofibras, en particular carbono, nanotubos, en particular carbono (nanotubos de carbono), dendrímeros, proteínas o liposomas con sustancias generadoras de señal. Las partículas coloidales se pueden detectar calorimétricamente.

En determinadas realizaciones, la molécula detectable es una enzima. En determinadas realizaciones, la enzima puede convertir sustratos en productos coloreados, por ejemplo, peroxidasa, proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa o fosfatasa alcalina. Por ejemplo, el sustrato incoloro X-gal se convierte mediante la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a un producto azul cuyo color se detecta visualmente.

Un marcador enzimático y sistema de detección mencionados anteriormente utilizan fosfatasa alcalina. Con fosfatasa alcalina (APP) son posibles diversas detecciones, como se ejemplifica a continuación: detección electroquímica: sustrato fenilfosfato, reacción enzimática de APP forma fenol, está unido a un sensor de fenol (por ejemplo, medición detectada electroquímicamente de la reacción de color: sustrato p-nitrofenil fosfato, la reacción enzimática de APP forma p-nitrofenol, detección de fluorescencia se colorea de amarillo: sustrato 4-metilumbeliferonil fosfato: reacción enzimática de APP forma residuo de metilumbeliferonil, que después de la excitación de fluorescencia se libera para detección de quimioluminiscencia:

Además, APP convierte selectivamente 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP o fosfato-X) y sal de nitroazul de tetrazolio (NBT). Los colorantes precipitan en las inmediaciones de las moléculas de AP y tiñen de color púrpura oscuro el entorno de los compuestos unidos.

La peroxidasa cataliza, por ejemplo, la oxidación de ABTS (2,2'-azino-bis-[ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) en presencia de  $H_2O_2$ . Debido a la estabilidad enzimática y a la gran cantidad de sustratos posibles, se prefiere peroxidasa de rábano picante. Otros marcadores enzimáticos que catalizan la generación de productos detectables son cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST).

En determinadas realizaciones, la molécula detectable es un isótopo radiactivo. La detección también se puede realizar mediante isótopos radiactivos con los que está etiquetado el aptámero, preferentemente  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{32}P$ ,  $^{33}P$ ,  $^{35}S$  o  $^{125}I$ , más preferiblemente  $^{32}P$ ,  $^{33}P$  o  $^{125}I$ . En el recuento de centelleo, la radiación radiactiva emitida por el complejo aptámero-diana etiquetado radiactivamente se mide indirectamente. La sustancia centelladora es excitada por la radiación radiactiva. Durante la transición al estado fundamental, la energía de excitación se libera nuevamente en forma de destellos de luz, que se amplifican y cuentan mediante un fotomultiplicador.

En determinadas realizaciones, la molécula detectable se selecciona de digoxigenina y biotina. Por lo tanto, los aptámeros también pueden estar etiquetados con digoxigenina o biotina, que están unidos, por ejemplo, mediante anticuerpos o estreptavidina, que a su vez pueden llevar una etiqueta, como, por ejemplo, un conjugado enzimático. El enlace covalente previo (conjugación) de un aptámero con una enzima se puede lograr de diversas formas conocidas. La detección de unión de aptámeros también puede ser radiactiva en un RIA (inmunoensayo radiactivo) con isótopos radiactivos, preferiblemente con  $^{125}I$ , o mediante fluorescencia en un FIA (fluoroimmunoensayo) con fluoróforos, preferiblemente con fluoresceína o FITC.

El aparato puede comprender además una región de introducción de muestra. La región de introducción de muestra puede comprender un puerto y puede proporcionarse corriente arriba de la primera región.

En determinadas realizaciones, el aparato puede comprender, además:

- a) una o más moléculas competidoras; y
- b) una o más moléculas de control.

En una determinada realización, las moléculas competidoras son cantidades definidas de moléculas diana inespecíficas y/o negativas que permiten discriminación con la muestra.

En una determinada realización, las moléculas de control son cantidades definidas de moléculas diana que permiten comparación con la muestra.

En otra realización, la molécula de control puede ser una secuencia de ADN/ARN no funcional (secuencia de ADN/ARN de control) que es complementaria a una molécula de captura de control que está localizada en una zona de control (descrita a continuación). La hibridación de la secuencia de ADN/ARN de control con la molécula de captura de control demostraría la funcionalidad principal del ensayo.

## Aparato

El aparato de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención se puede proporcionar en diversos formatos diferentes. En determinadas realizaciones, el aparato puede ser un biosensor. Los biosensores se encuentran en muchos formatos diferentes. En un aspecto adicional, la invención se refiere a un biosensor que comprende un aptámero de acuerdo con la invención.

En determinadas realizaciones, el biosensor comprende los siguientes elementos: una primera región que comprende la molécula de ácido nucleico y un transductor que convierte el evento de unión entre una molécula de ácido nucleico y una molécula diana en una señal eléctricamente cuantificable. La primera región puede estar comprendida en un recipiente o una sonda o similar.

Además, el aparato puede comprender adicionalmente otros elementos, tales como un dispositivo de procesamiento de señal, una electrónica de salida, un dispositivo de visualización, un dispositivo de procesamiento de datos, un dispositivo de memoria de datos e interfaces para otros dispositivos.

A partir de una muestra que se pone en contacto con el biosensor, por ejemplo, una mezcla del complejo que contiene la molécula diana, la molécula diana se puede identificar mediante la unión específica de la molécula de ácido nucleico.

La sensibilidad del sensor puede verse influenciada por el transductor utilizado. El complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana que se une al oligonucleótido de captura se puede convertir mediante el transductor en una señal utilizable electrónicamente. El transductor convierte la señal del evento de unión, que es proporcional a la concentración de la molécula diana en la muestra, en una señal de medición cuantificable eléctrica. La señalización se produce debido a la interacción molecular entre la molécula de ácido nucleico.

Con un biosensor de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, se puede obtener información analítica cualitativa, cuantitativa y/o semicuantitativa. El aparato de acuerdo con determinadas realizaciones puede ser particularmente adecuado para uso en alimentos, agua y análisis medioambiental y tratamiento de agua, especialmente de agua potable y aguas residuales, en diagnóstico y para uso en hospitales y centros asistenciales.

En determinadas realizaciones, la primera y/o región adicional pueden comprender la superficie del transductor, y el transductor puede detectar los eventos de liberación y recaptura descritos en la presente.

La recaptura del complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico se puede medir, por ejemplo, mediante transductores ópticos, microgravimétricos, térmicos o acústicos, por ejemplo, mediante transductores ópticos o microgravimétricos. La medición en transductores ópticos se puede basar en principios de fotometría, mediante los cuales se detectan, por ejemplo, cambios de intensidad de color o de luminiscencia. Los métodos ópticos incluyen la medición de fluorescencia, fosforescencia, bioluminiscencia y quimioluminiscencia, transiciones infrarrojas y dispersión de luz. Los métodos ópticos también incluyen la medición de los cambios en el espesor de la capa cuando la diana se une al aptámero. El cambio en el espesor de capa puede, por ejemplo, realizarse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), interferometría de biocapa (BLI) o espectroscopia de interferencia reflectométrica (RIFS). Además, se pueden medir la interferencia en capas finas (espectroscopia de interferencia reflectométrica) y el cambio del campo evanescente.

Los transductores acústicos utilizan los cambios de frecuencia de un cristal de cuarzo piezoeléctrico, que detecta cambios de masa altamente sensibles que ocurren cuando la diana se une al aptámero. El cristal de cuarzo utilizado se coloca en un campo eléctrico oscilante y se mide la frecuencia de resonancia del cristal. Un cambio de masa en la superficie del cristal de cuarzo, por ejemplo, mediante reacción del analito con el receptor previamente inmovilizado en la superficie del cristal ocasiona un cambio en la frecuencia de resonancia, que puede cuantificarse.

Los transductores electroquímicos pueden, por ejemplo, medir el cambio en la concentración de marcadores activos redox en la superficie del electrodo, o cambiar la concentración de sustratos o productos activos redox, por ejemplo, se consumen o forman en la reacción enzimática de un marcador enzimático. Los transductores térmicos miden el calor de la reacción de unión del aptámero-diana.

En determinadas realizaciones, el aparato es un aparato BLI (interferometría de biocapa) o un aparato similar. En determinadas realizaciones, la primera región está comprendida en una sonda biosensora. La región adicional que contiene el oligonucleótido de captura está comprendida en una segunda sonda biosensora. La primera sonda se incuba con la muestra. Si la molécula diana está presente en la muestra, la molécula de ácido nucleico se desplaza del complejo con el oligonucleótido de inmovilización, para formar un complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico. Como consecuencia, la secuencia de ácido nucleico se desplaza de la sonda y está presente en la muestra. El desplazamiento de la molécula de ácido nucleico produce una reducción cuantificable en la señal y puede medirse mediante BLI. Luego se incuba la segunda sonda con la muestra que contiene el complejo molécula de ácido nucleico-diana. La recaptura de la molécula de ácido nucleico o del complejo molécula de ácido nucleico-diana proporciona una señal de asociación cuantificable y puede medirse mediante BLI.



Dependiendo del diseño, con el dispositivo de medición se puede obtener información analítica cualitativa, cuantitativa y/o semicuantitativa sobre la diana a medir. Los medios de detección pueden ser, por ejemplo, un medidor portátil que se pueda utilizar en el lugar, tal como un medidor liviano de bolsillo.

- 5 En determinadas realizaciones, el aparato comprende un dispositivo de flujo lateral. Por ejemplo, el biosensor puede ser un dispositivo de flujo lateral. Los dispositivos de flujo lateral también pueden denominarse como pruebas de flujo lateral, ensayos de flujo lateral e inmunoensayos de flujo lateral.

- 10 La Figura 2 es una representación esquemática de un dispositivo de flujo lateral 1. El dispositivo de flujo lateral comprende una primera región 13 que comprende un soporte 7 sobre el que está unido un oligonucleótido de inmovilización 5. El oligonucleótido de inmovilización está configurado para hibridarse a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un aptámero 3 sobre una porción de su secuencia.

- 15 Se introduce una muestra en la primera región. La muestra es, acertadamente, un líquido. Si la muestra comprende una molécula diana 9, el aptámero se une a la molécula diana y sufre un cambio conformacional, lo que da como resultado que el aptámero se disocie del oligonucleótido de inmovilización. El complejo molécula diana-aptámero 11 es entonces libre en solución. Convenientemente, el dispositivo de flujo lateral comprende una trayectoria de flujo desde la primera región hasta una región adicional 15. El complejo molécula diana-aptámero fluye desde la primera región hasta la región adicional.

- 20 La región adicional 15 comprende adecuadamente una región de prueba que incluye un oligonucleótido de captura 13. El oligonucleótido de captura 13 comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia del aptámero cuando el aptámero está en complejo con la molécula diana. El aptámero, cuando está en un complejo con la molécula diana, se recaptura luego en la región de prueba. La presencia del complejo aptámero-molécula diana en la región de prueba puede entonces detectarse y opcionalmente cuantificarse proporcionando así una medición de la presencia y opcionalmente cantidad de molécula diana en la muestra.
- 25 Convenientemente, el dispositivo de flujo lateral comprende una región de control, por ejemplo, una línea de control que está configurada para confirmar que la prueba está funcionando. Además, el dispositivo de flujo lateral comprende adecuadamente una o más líneas de prueba diana.

- 30 El dispositivo de flujo lateral puede ser en la forma de una tira. Convenientemente, el soporte comprende una membrana, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa. La membrana puede estar formada a partir de material tejido o no tejido. El soporte puede comprender adicionalmente una almohadilla, por ejemplo, una almohadilla absorbente, a la que se le puede aplicar la muestra. Convenientemente, la almohadilla absorbente está configurada para hacer
- 35 pasar la muestra a través de la membrana. En determinadas realizaciones, la almohadilla absorbente comprende fibras de celulosa.

- En determinadas realizaciones, el aparato puede comprender adicionalmente un elemento de respaldo que es adyacente al soporte.

- 40 El ensayo de flujo lateral puede funcionar de la siguiente manera:

- Los aptámeros seleccionados se inmovilizan sobre un soporte, por ejemplo, una 'almohadilla de conjugación' mediante hibridación a la secuencia complementaria en un oligonucleótido de inmovilización.

- 45 La unión de la molécula diana ocasiona un cambio conformacional en el aptámero que da como resultado la interrupción de la hibridación y subsecuentemente su desplazamiento del oligonucleótido de inmovilización. Los aptámeros desplazados en complejo con la molécula diana se transportan a lo largo de la tira LFD, en la matriz de la muestra. Los aptámeros desplazados se recapturan mediante hibridación a un segundo oligonucleótido complementario inmovilizado formando una 'línea de prueba' en el LFD. También se pueden correr aptámeros adicionales contra otras moléculas diana en la misma muestra y capturarlos en otras secuencias de oligonucleótidos complementarios inmovilizados en otras "líneas de prueba", dando lugar a un ensayo LFD multiplexado.
- 50

- 55 Una muestra líquida sospechosa de contener una diana para el aptámero identificado utilizando el método de determinadas realizaciones de la presente invención se aplica a la primera región en una ubicación, o la tira se humedece con la muestra en un sitio. Este lugar puede ser la denominada 'almohadilla/zona de aplicación de muestra' de la tira. La tira contiene un material de matriz a través del cual el medio de muestra líquido y la molécula diana suspendida o disuelta en el mismo pueden fluir por acción de capilaridad desde una almohadilla/zona de aplicación de muestra a una zona de detección donde una señal detectable o la ausencia de dicha señal indica la presencia o ausencia de la diana.
- 60

- Como se describe en la presente, se utiliza un aptámero etiquetado, en el que se puede utilizar cualquier etiqueta descrita anteriormente. Preferiblemente se utiliza una etiqueta que conduce a una señal visualmente detectable en la zona de detección de la tira de prueba. La presencia o ausencia de la diana en la muestra se puede detectar mediante
- 65 la presencia o ausencia de un aptámero etiquetado en la zona de detección.

En una realización, el soporte comprende una tira de prueba. En determinadas realizaciones, se utiliza un aptámero etiquetado enzimáticamente. Si la molécula diana está presente en la muestra, forma un complejo con el aptámero etiquetado enzimáticamente, que fluye a lo largo de la tira hasta una zona de detección que contiene un sustrato para la etiqueta enzimática que es capaz de producir una reacción de color en presencia de la etiqueta enzimática. En determinadas realizaciones, la tira contiene otra zona en la que la diana está inmovilizada de modo que se detecta el aptámero etiquetado que no se une con la diana debido a la ausencia de suficiente diana en la muestra y, por lo tanto, se evita que alcance la zona de detección.

El soporte, por ejemplo, la tira de prueba se puede producir a partir de cualquier material que pueda humedecerse con una muestra y en el que se pueda introducir un aptámero de acuerdo con determinadas realizaciones. Son particularmente preferibles los materiales a través de los cuales una muestra y una diana contenidas en los mismos pueden fluir por acción de capilaridad. Los ejemplos son nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel sin recubrimiento, papel poroso, filamento viscoso, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo, o nailon, así como todos los demás materiales comunes en los ensayos de flujo lateral.

La tira de prueba ya se puede utilizar como tal para detectar la presencia de la diana en una muestra. Para uso, la tira puede sumergirse en una muestra, en el caso de un ensayo de flujo lateral, por ejemplo, con un solo extremo, que luego sirve como la primera región, es decir, una zona de aplicación de muestra.

Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a un dispositivo de ensayo de flujo lateral que comprende la tira de prueba descrita anteriormente. Además de la tira de prueba, el dispositivo puede comprender, por ejemplo, una cubierta en la que está embebida la tira de prueba y que presenta una abertura que preferentemente se puede cerrar a la zona de aplicación de la muestra de la tira de prueba. En determinadas realizaciones, el aparato comprende una zona de control (una zona que está separada de la zona de detección, lo que demuestra la funcionalidad general de la tira de prueba).

En una determinada realización, la zona de control puede comprender una secuencia de captura de control que es complementaria a una secuencia de ADN/ARN de control que no se une a la diana. La hibridación de la secuencia de ADN/ARN de control con la molécula de captura de control daría una señal positiva que es distinta de la señal de prueba y demuestra la funcionalidad principal del ensayo.

En determinadas realizaciones, el aparato comprende al menos un recipiente. La primera región puede estar comprendida en un primer recipiente y la región adicional puede estar comprendida en un recipiente adicional. En determinadas realizaciones, el aparato puede ser adecuado para uso en un ensayo ELONA. En la Figura 4 se muestra una representación esquemática de un aparato ELONA. El aparato 100 puede comprender una primera región 110 que está comprendida en un recipiente 120. Una región adicional 120 está comprendida en un recipiente adicional 130. Una molécula de ácido nucleico 150 específica a una molécula diana 170 se proporciona inmovilizada mediante hibridación a un oligonucleótido de inmovilización 160 en la primera región. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido de inmovilización se inmoviliza a la superficie del recipiente 120. Se añade al recipiente una muestra que puede contener una molécula diana. Si la muestra contiene la molécula diana, la molécula diana se une al aptámero dando como resultado un cambio conformacional que a su vez da como resultado el desplazamiento del aptámero del oligonucleótido de inmovilización. Esto se muestra en la Figura 4, segunda imagen superior. Después de un periodo de tiempo predeterminado suficiente para permitir que ocurra el desplazamiento, la muestra de ensayo se transfiere a un recipiente adicional 130 que comprende un oligonucleótido de captura inmovilizado en una superficie del pocillo. El oligonucleótido de captura comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico del aptámero. Una molécula de detección 140, por ejemplo, una enzima conjugada con estreptavidina tal como HRP, se captura en el aptámero (cuando el aptámero está biotinilado), permitiendo así la detección con un sustrato enzimático (por ejemplo, TMB).

La sección inferior de la Figura 4 ilustra un ensayo ELONA cuando la molécula diana no está presente en la muestra. Los aptámeros seleccionados se inmovilizan en el pocillo de ensayo mediante hibridación a la secuencia complementaria en el oligonucleótido de inmovilización (que a su vez está inmovilizado en una superficie del primer recipiente). La adición de moléculas no diana en la muestra no tiene ningún efecto sobre el aptámero que permanece inmovilizado en el oligonucleótido de inmovilización. La muestra del ensayo se transfiere al recipiente adicional y no se capturan aptámeros en el oligonucleótido de captura. La enzima conjugada con estreptavidina (por ejemplo, HRP) no se captura, por lo que no se mide ninguna señal con sustratos enzimáticos (por ejemplo, TMB).

En otra realización específica, el soporte sólido y el aptámero forman un microarreglo, o el llamado "chip de aptámero de ADN o ARN", que puede ser de un canal o multicanal. En el microarreglo, uno o varios aptámeros, así como materiales de referencia para la compensación de señal básica, se pueden disponer en diversos puntos de medición en forma de arreglo. En un chip multicanal esta disposición se realiza en los canales individuales. Por lo tanto, es posible la medición múltiple en paralelo de una muestra o, con diferentes aptámeros, la medición en paralelo de diferentes analitos en una muestra.

## Ejemplos

A continuación, la invención se explicará con más detalle mediante ejemplos no limitantes de realizaciones específicas. En los experimentos de ejemplo se utilizan reactivos estándar y amortiguadores libres de contaminación.

### Ejemplo 1: Ensayo de biosensor (ensayo basado en aptámeros para detectar moléculas pequeñas utilizando interferometría de biocapa - BLI)

#### 5 Oligonucleótidos Y Aptámeros

El ensayo se realizó utilizando moléculas de ácido nucleico (aptámeros de ADN) específicas para el fármaco quimioterapéutico Imatinib. El aptámero A tenía 100 nucleótidos de longitud y comprende una etiqueta 5'FAM (fluoresceína). La secuencia de nucleótidos del aptámero A se establece a continuación:

10 5'-ATCCACGCTCTTTTCTCCCCCGCTATGTGAGGCTCGATCGTTCGGTGTGTTTTAAAGGGTACAGATCCTG  
GGCGGGGGGCATTGAGGGTGACATAGG- 3' (SEQ ID NO:1)

15 La secuencia subrayada se refiere al primer y segundo sitios cebadores utilizados para la amplificación del aptámero, pero también se utiliza para la recaptura del aptámero desplazado, y la secuencia en *itálicas* se refiere a la región de inmovilización del aptámero (es decir, secuencia de ácido nucleico del aptámero capaz de unirse a al menos una porción de la secuencia de inmovilización).

20 El aptámero se purificó mediante HPLC antes de utilizarse y fue fabricado por IDT, Bélgica). Para el ensayo, el aptámero se inmoviliza en sondas de sensor recubiertas con estreptavidina mediante el oligonucleótido de inmovilización biotinilado que comprende una etiqueta de biotina 5' y un espaciador HEGL interno ISP18. El oligonucleótido de inmovilización se purificó mediante HPLC antes de utilizarse y también fue fabricado por IDT, Bélgica. El oligonucleótido de inmovilización contiene una región definida de 12 nucleótidos (GATCGAGCCTCA, SEQ ID NO: 2) que es complementaria reversa a una región del aptámero (mostrada en *itálicas*) que permite hibridación entre ambas moléculas. Además, el oligonucleótido de inmovilización lleva una biotina 5' unida mediante un residuo de hexaetilenglicol (HEGL), que es responsable por el acoplamiento del oligonucleótido de inmovilización a las perlas magnéticas modificadas con estreptavidina.

30 Para recapturar los complejos aptámero-diana, se utilizaron dos oligonucleótidos de captura diferentes: los oligonucleótidos revFOR y REV. Ambos oligonucleótidos de captura contienen regiones definidas de 19 nucleótidos que son complementarias a la primera y última región del aptámero, respectivamente, y permiten hibridación entre aptámero y oligonucleótidos de captura. revFOR tenía 19 nucleótidos de longitud y comprende una etiqueta de biotina 5'. El oligonucleótido de captura se purificó mediante HPLC antes de utilizarse y fue fabricado por IDT, Bélgica. REV tenía 19 nucleótidos de longitud y comprende una etiqueta de biotina 3'. El oligonucleótido de captura se purificó mediante HPLC antes de utilizarse y fue fabricado por IDT, Bélgica. Las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos de captura se muestran a continuación:

35 revFOR - 5'-GGAGAAAAAGAGCGTGGAT-3' (SEQ ID NO:3)

40 REV- 5'-CCTATGTACCCCTCAATGC-3' (SEQ ID NO:4).

#### Amortiguadores, Diana

45 El amortiguador BB (20 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, Tween 20 al 0.01%) sirvió como amortiguador de hibridación. Se utilizó amortiguador B&W (5 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM de EDTA, 1 M de NaCl, Tween 20 al 0.01%) para inmovilizar oligonucleótidos biotinilados en superficies recubiertas con estreptavidina. El amortiguador PBS6 (10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/2 Mm de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0, 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, Tween 20 al 0.01%) sirvió como amortiguador de unión y lavado durante el ensayo. La molécula diana es un quimioterapéutico utilizado para el tratamiento del cáncer (Imatinib). Se prepararon soluciones madre de 1 mg/mL en DMSO y se almacenaron hasta su uso a -20°C.

#### 50 Mediciones De Interferometría De Biocapa (BLI)

55 BLI es una tecnología libre de etiquetas para medir interacciones biomoleculares. Es una técnica analítica óptica que analiza cambios en el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde dos superficies: una capa de ligando inmovilizado en la punta del biosensor y una capa de referencia interna. Cualquier cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor ocasiona un cambio en el patrón de interferencia que se puede medir en tiempo real. Solamente moléculas que se unen a o se disocian del biosensor pueden cambiar el patrón de interferencia y generar un perfil de respuesta en el sensor BLI. Las moléculas sin unir, los cambios en el índice de refracción del medio circundante o cambios en la tasa de flujo no afectan el patrón de interferencia. El principio de selección por desplazamiento ofrece la posibilidad de desarrollar ensayos de detección basados en la formación de dúplex entre la secuencia de inmovilización de los aptámeros seleccionados y el oligonucleótido de inmovilización. El cambio conformacional dependiente de la diana conduce a la liberación del aptámero de la estructura dúplex. Este cambio del dúplex hibridado al estadio desplazado del aptámero se puede utilizar para generar una señal registrable. Los experimentos descritos aquí se realizaron utilizando los instrumentos BLItz u Octet QK (ForteBio, Pall Life Sciences, EE.UU.).

#### Ensayo De Desplazamiento Del Aptámero Por BLI

Para la inmovilización del aptámero sobre sondas biosensoras (Streptavidin-SA Dip&Read Biosensors, ForteBio, Pall Life Sciences, EE.UU.), se pre hibridaron 1.5  $\mu$ M de aptámero y 1  $\mu$ M de oligonucleótido de inmovilización en amortiguador BB calentando la mezcla a 95°C durante 10 minutos e inmediatamente enfriando a 4°C durante 5 minutos antes de mezclar con 2x de amortiguador B&W en una proporción 1:1. Se incubaron sondas recubiertas con estreptavidina con esta mezcla de pre hibridación durante 5 minutos. Se realizaron tres pasos de lavado (30 seg, 120 seg, 30 seg) con amortiguador PBS6 para eliminar material de ADN débilmente inmovilizado. Luego, las sondas se incubaron con solución diana (20  $\mu$ M en PBS6) durante 5 minutos. La unión a la diana ocasiona un desplazamiento del aptámero que se observa como una disminución en la señal. Los complejos aptámero-diana eluidos se recuperaron para pasos subsecuentes en el 'ensayo de recaptura'.

#### Recaptura De Complejos Aptámero-Diana, Analizada Por BLI

Los oligonucleótidos de captura biotinilados 'revFOR' y 'REV' se inmovilizaron en sondas biosensoras separadas incubando una sonda recubierta con estreptavidina durante 3 minutos con oligonucleótidos revFOR y REV (1  $\mu$ M en amortiguador B&W), respectivamente. Se realizaron tres pasos de lavado (30 seg, 60 seg, 30 seg) con amortiguador PBS6 para eliminar el material de oligonucleótido débilmente inmovilizado. Luego, las sondas se incubaron durante 5 minutos con el material eluido de la diana (complejos aptámero-diana) obtenido del ensayo de desplazamiento del aptámero (véase anteriormente). Se registra una respuesta positiva cuando los complejos aptámero-diana se recapturan en los oligonucleótidos de captura inmovilizados.

#### Ejemplo 2: Ensayo de fluorescencia basado en placas de microtitulación utilizando aptámeros para detectar moléculas pequeñas en diferentes matrices/sustratos (ensayo tipo ELISA)

##### Oligonucleótidos Y Aptámeros:

El ensayo se realizó utilizando moléculas de ácido nucleico (aptámeros de ADN) específicas para el antibiótico Moxifloxacin.

El aptámero comprende el mismo primer y segundo sitios cebadores que el aptámero de imatinib descrito anteriormente y se utilizan para amplificación del aptámero y también se utilizan para recaptura del aptámero desplazado. El aptámero también incluye una secuencia de ácido nucleico capaz de unirse a al menos una porción de la secuencia de inmovilización.

El oligonucleótido de inmovilización (complementario a parte del aptámero) comprende una etiqueta de Biotina 5' y un espaciador HEGL interno ISP18. El oligonucleótido de inmovilización se purificó mediante HPLC antes de utilizarse y también fue fabricado por IDT, Bélgica. Para el ensayo, el aptámero se inmoviliza en placas de microtitulación (MTP) recubiertas con estreptavidina mediante el oligonucleótido de inmovilización. El oligonucleótido de inmovilización contiene una región definida de 12 nucleótidos (GATCGAGCCTCA, SEQ ID NO: 2) que es complementaria a una región del aptámero que permite hibridación entre ambas moléculas. Además, el oligonucleótido de inmovilización lleva una biotina 5' unida a través de un residuo de hexaetilenglicol (HEGL), que es responsable por el acoplamiento del oligonucleótido de inmovilización a las MTP modificadas con estreptavidina. Para recapturar los complejos aptámero-diana, se utilizó oligonucleótido de captura revFOR. El oligonucleótido de captura contiene regiones definidas de 19 nucleótidos que son complementarias a la primera región del aptámero (SEQ ID NO: 3) y permite hibridación entre aptámero y oligonucleótido de captura (revFOR: tenía 19 nucleótidos de longitud y comprende una etiqueta de biotina 5'. El oligonucleótido de captura se purificó mediante HPLC antes de utilizarse y fue fabricado por IDT, Bélgica). En realizaciones alternativas, el oligonucleótido de captura comprende una secuencia como se establece en SEQ. ID. No. 4.

##### Amortiguadores, Diana, Matrices/Sustratos

El amortiguador BB (20 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM de NaCl, 2 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de  $CaCl_2$ , Tween 20 al 0.01%) sirvió como amortiguador de unión, lavado e hibridación durante el ensayo. Se utilizó amortiguador B&W (5 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM de EDTA, 1 M de NaCl, Tween 20 al 0.01%) para inmovilizar oligonucleótidos biotinilados sobre superficies recubiertas con estreptavidina. La molécula diana, el antibiótico, se obtuvo de Sigma-Aldrich, EE.UU. Se prepararon soluciones madre de 5 mM de antibiótico en DMSO y se almacenaron hasta su uso a -20°C. Las pruebas se realizaron en 4 sustratos/matrices diferentes: plasma humano (HUMANPL32NCU2N, BioIVT, Reino Unido); leche (leche entera con grasa orgánica, Sainsbury's Supermarket), agua de río - esterilizada mediante filtro, filtro de 0.22  $\mu$ m, ESF-PV-25-022, CM Scientific, Reino Unido); orina simulada (151.5 mM de urea, 64 mM de NaCl, 30 mM de  $NaH_2PO_4$ , 8.85 mM de creatinina, 50 mg/L de BSA).

##### Mediciones De Fluorescencia

Los marcadores de fluorescencia incorporados en los aptámeros permiten la cuantificación del ADN del aptámero después de diferentes pasos del proceso, mediante un ensayo de lector de placas de fluorescencia.

Las mediciones de fluorescencia del ADN etiquetado con fluoresceína (FAM) se realizaron en un lector de placas de fluorescencia BMG (FLUOstar OPTIMA, BMG, Reino Unido) utilizando las siguientes condiciones de medición: excitación a 485 nm/emisión a 520 nm.

## 5 Ensayo De Desplazamiento Del Aptámero (Ensayo De Fluorescencia Basado En Placas De Microtitulación)

Para la inmovilización del aptámero sobre MTP recubiertas con estreptavidina (placas de 96 pocillos negras Pierce Streptavidin Coated, HBC, con amortiguador de bloqueo SuperBlock, Thermo Scientific, EE.UU), se pre hibridaron 0.75  $\mu$ M de aptámero y 0.5  $\mu$ M de oligonucleótido de inmovilización en amortiguador BB calentando la mezcla a 95°C durante 10 minutos y enfriándola inmediatamente a 4°C durante 5 minutos antes de mezclarla con 2x de amortiguador B&W en una proporción 1:1. La placa de microtitulación MTP 1 se incubó con esta mezcla de pre hibridación durante 1 hora a temperatura ambiente mientras se agitaba a 1000 rpm en un agitador de MTP (IKA Schättler MTS 4, IKA Werke GmbH & Co. KG, Alemania). La eficiencia de la inmovilización se determinó comparando la fluorescencia de entrada y salida antes y después de la incubación respectivamente. Esto permite el cálculo de la cantidad aproximada de aptámero cargado mediante mediciones de fluorescencia.

La placa cargada con aptámero (MTP 1) se lavó extensamente con amortiguador BB para eliminar ADN débilmente inmovilizado antes de incubarla durante 1 hora a temperatura ambiente (1000 rpm en agitador de MTP) con un gradiente de antibiótico diana (200  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 1.6  $\mu$ M, 0.32  $\mu$ M, 0  $\mu$ M) preparado en 4 matrices diferentes (plasma, leche, agua de río y orina simulada) a 4 concentraciones (0%, 10%, 25% y 40% v/v de matriz en amortiguador BB). Se recuperó el material eluido de la diana (de MTP 1) y se determinó la cantidad de aptámero unido a la diana mediante mediciones de fluorescencia.

## Resultados

Los datos corregidos tanto para plasma como para leche muestran buenas respuestas dependientes de la concentración de antibiótico. También se observó un elemento de unión potencialmente no específico en las concentraciones más altas de matriz. Esto no afecta la validez del ensayo o los datos; pero indica que se requeriría el estándar de calibración correcto si el ensayo se va a utilizar para cuantificar con precisión los residuos en estas matrices. Los datos tampoco muestran casi ninguna diferencia en la señal para las diferentes concentraciones de agua de río; lo que sugiere que no tiene ningún efecto sobre el ensayo. Los datos corregidos para la orina simulada sí muestran un aumento de la señal dependiente del antibiótico, pero que la señal se reduce al aumentar las concentraciones de la muestra. Esto no afecta la validez del ensayo, si se prepara el estándar de calibración correcto.

## Recaptura De Complejos Aptámero-Diana (Ensayo De Fluorescencia Basado En Placas De Microtitulación)

El oligonucleótido de captura biotinilado 'revFOR' se inmovilizó sobre la superficie de MTP 2 recubiertas con estreptavidina incubando durante 1 hora a temperatura ambiente mientras se agitaba a 1000 rpm en agitador de MTP con 0.5  $\mu$ M de oligonucleótido de captura revFOR, en amortiguador de inmovilización. La placa cargada con oligonucleótido de captura (MTP 2) se lavó exhaustivamente con amortiguador BB para eliminar ADN débilmente inmovilizado. El material eluido por la diana de MTP 1 se transfirió después del ensayo de desplazamiento del aptámero (véase anteriormente) a MTP 2 (inmovilizado con oligonucleótido de captura) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente mientras se agitaba a 1000 rpm en agitador de MTP. El material no capturado se eliminó de MTP 2 y la cantidad de aptámero recapturada se determinó mediante mediciones de fluorescencia (después de lavar para eliminar los aptámeros liberados y cualquier matriz restante).

## Resultados

Los datos muestran que los aptámeros se recapturaron en cada matriz siguiendo la misma tendencia dependiente de la concentración diana que el material de entrada. En plasma y leche se puede observar un claro efecto de concentración de matriz. Los aptámeros se recapturaron en cantidades más bajas en concentraciones más altas de matriz. Esto no afecta la validez del ensayo o los datos; simplemente indica que se necesitarían curvas estándar de calibración correctas si el ensayo se va a utilizar para cuantificar con precisión los residuos en estas matrices.

## Ejemplo 3- ensayo de recaptura dependiente de la concentración

El ensayo se realizó utilizando aptámero de Moxifloxacino etiquetado con biotina (1500 pmol) y oligonucleótido de recaptura (3400 pmol de revFOR o REV) como se describió anteriormente.

En el Paso 1, el oligonucleótido de recaptura se inmovilizó en una placa de 96 pocillos añadiendo primero 200  $\mu$ l de 1x de amortiguador B&W a cada pocillo. Luego se agregaron diluciones en serie de una mezcla de oligo biotinilado (340  $\mu$ l de 5x de amortiguador 'B&W', 3400 pmol de oligo etiquetado con biotina (delantero o reverso), agua hasta 1700  $\mu$ l) a través de los pocillos y la placa se incubó en un agitador orbital (1000 rpm, temperatura ambiente, 1 hora).

En un segundo paso, se preparó un gradiente de aptámero a través de una placa de 96 pocillos a pH 6.8 o pH 7.4 en amortiguador BB y se determinó la fluorescencia de entrada. La placa del paso (1) se lavó en 200  $\mu$ l 3x de 1x de BB al pH adecuado (6.8 o 7.4). Se añadió una mezcla de 100  $\mu$ l de cada pocillo de la placa del paso (2) a los pocillos

correspondientes de la placa lavada del paso (3) y la placa se incubó en un agitador orbital (1000 rpm, temperatura ambiente, 1 hora).

Se recuperó la placa del paso (4) y se transfirieron 100 µl de material sin unir a una placa nueva de 96 pocillos y se midió la fluorescencia del material "sin unir" utilizando un lector de placas BMG. La placa del paso (4) se lavó con 200 µl 3 x de 1x de amortiguador BB enfriado con hielo (pH 6.8, incubación de 2 minutos) y se determinó la fluorescencia del material restante en la superficie de la placa.

## Resultados

Los datos se graficaron para demostrar el efecto del aumento del oligo biotinilado pre inmovilizado sobre la cantidad de aptámero unido (fluorescencia). La Figura 8 muestra que tanto el oligo delantero como el reverso inmovilizados son capaces de capturar el aptámero etiquetado con FAM por los extremos 5' o 3' respectivamente. La Figura 8 también muestra que el pH del amortiguador de hibridación tiene poco efecto. Cada gráfica también muestra que las placas alcanzan un 'punto de saturación'. Por ejemplo, cuando se añaden 50 pmol de aptámero etiquetado con FAM, se observa un aumento de carga de hasta 50 pmol de oligo biotinilado. Por encima de esto, no se une ningún aptámero adicional. 2 pmol de aptámero de entrada es insuficiente para observar una tendencia.

También se representaron gráficamente los datos para demostrar el efecto del aumento de la cantidad de entrada del aptámero sobre la cantidad de aptámero unido (fluorescencia). Nuevamente, los resultados muestran que tanto el oligo delantero como reverso inmovilizados son capaces de capturar el aptámero etiquetado con FAM (Figura 7). También muestran que el pH del amortiguador de hibridación tiene poco efecto. Cada gráfica también muestra que el aumento de la entrada de aptámero conduce a un aumento de la señal (y, por tanto, de unión). Nuevamente, la comparación entre conjuntos de datos muestra que las placas alcanzan un 'punto de saturación'. Esto se observa más claramente en el punto superior de cada conjunto (entrada de 50 pmol), donde se observa saturación clara a ~50 pmol de oligo inmovilizado.

## Conclusiones

- La recaptura de aptámeros es posible en amortiguadores de selección tanto a pH 6.8 como a pH 7.4 (amortiguadores más comunes utilizados para la selección de moléculas pequeñas).
- La recaptura es dependiente de la concentración y es lineal cuando se utilizan 50 pmol de oligo de captura biotinilado por pocillo.
- Se puede realizar una optimización adicional para mejorar la carga si es necesario.

## Ejemplo 4 - ensayos de desplazamiento y recaptura

Se combinaron ensayos de desplazamiento y recaptura para demostrar ambos componentes en un solo ensayo. En este experimento, los aptámeros se hibridaron al oligo de inmovilización y se inmovilizaron sobre la superficie de la placa de microtitulación (placa A). Luego, los aptámeros se desplazaron de la primera placa (A) y luego se recapturaron en la segunda placa (B) pre inmovilizada con un 'oligo de captura' biotinilado. Se probaron el mismo aptámero y la misma diana en una variedad de matrices comunes (plasma, agua de río, leche y orina) para demostrar la versatilidad de esta plataforma.

## Resultados

En este ensayo, la cantidad de aptámero etiquetado fluorescentemente retenido en la placa (después del desplazamiento inducido por la diana) se cuantifica y grafica contra la concentración diana (Figura 11). Los datos muestran una clara pérdida de señal de fluorescencia dependiente de la concentración diana de la primera placa (A), mostrando que el aptámero ha sido desplazado por la diana (en cada una de las diferentes matrices).

A continuación, los aptámeros desplazados se recapturan en la segunda placa, pre inmovilizada con el 'oligo de captura' biotinilado (B). Nuevamente, se observa un aumento en las señales dependiente de la concentración para cada una de las matrices, lo que sugiere que la matriz no interfiere con la recaptura.

## Conclusiones

- El desplazamiento del aptámero muestra una respuesta dependiente de la concentración en diversas matrices diferentes.
- Los aptámeros desplazados se pueden recapturar subsecuentemente en una segunda placa ELISA, pre inmovilizada con el 'oligo de captura' biotinilado.
- La presencia de matriz (plasma, etc.) o de la molécula diana, no interfiere con la recaptura.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprenden" y "contienen" y sus variaciones significan "incluyendo, pero no limitado a" y no pretenden (y no excluyen) otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o pasos. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se utiliza

el artículo indefinido, se debe entender que la memoria descriptiva contempla tanto pluralidad como singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Aparato para detectar la presencia, ausencia o nivel de una molécula diana en una muestra, el aparato comprende:

- 5 a) una primera región que comprende:
- i) un soporte; y
  - ii) un oligonucleótido de inmovilización; y
  - 10 iii) una molécula de ácido nucleico que tiene una afinidad de unión a una molécula diana, en la que la molécula de ácido nucleico está configurada para formar un complejo con la molécula diana,

15 en la que el oligonucleótido de inmovilización está unido directa o indirectamente al soporte, y además en la que el oligonucleótido de inmovilización comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico y en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse al oligonucleótido de inmovilización y además en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de ser desplazada del complejo con el oligonucleótido de inmovilización si la molécula diana está presente en la muestra; el aparato comprende además:

- 20 b) una región adicional que comprende:
- i) un soporte; y
  - ii) un oligonucleótido de captura unido directa o indirectamente al soporte, en el que el oligonucleótido de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos
  - 25 parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, en el que el oligonucleótido de captura está configurado para hibridarse a la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico cuando en complejo con la molécula diana para capturar el complejo molécula de ácido nucleico-molécula diana permitiendo así detectar la presencia o el nivel de la molécula diana.

30 2. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un medio de detección para detectar la molécula de ácido nucleico cuando está en un complejo con el oligonucleótido de captura,

35 opcionalmente en la que la molécula de ácido nucleico comprende al menos una región de secuencia de ácido nucleico fija, y en la que el oligonucleótido de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la región de secuencia de ácido nucleico fija de la molécula de ácido nucleico, opcionalmente en la que la molécula de ácido nucleico comprende una primera región de secuencia de ácido nucleico fija y una segunda región de secuencia de ácido nucleico, y en la que opcionalmente la primera región de secuencia de ácido nucleico fija está localizada en una región extremo 5' de la molécula de ácido nucleico y la segunda región de secuencia de ácido nucleico fija está localizada en una región extremo 3' de la molécula de ácido nucleico.

40 3. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de inmovilización está unido indirectamente al soporte mediante una molécula enlazadora, y además en el que la molécula de ácido nucleico está configurada para hibridar al oligonucleótido de inmovilización cuando el oligonucleótido de inmovilización se hibrida a la molécula enlazadora,

45 opcionalmente, en el que el aparato comprende además un medio de detección para detectar la formación de un complejo que comprende el oligonucleótido de captura y la molécula de ácido nucleico.

50 4. Aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende un dispositivo de ensayo de flujo lateral, ensayo de oligonucleótido ligado a enzima (ELONA) o interferometría de biocapa (BLI) y/o en el que se detecta y cuantifica la recaptura del complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico.

5. Aparato de acuerdo con la reivindicación 4, en el que:

- 55 (i) la primera región comprende una región receptora de muestra;
- (ii) el aparato comprende además una trayectoria de flujo entre la primera región y la región adicional, en la que opcionalmente la trayectoria de flujo comprende una membrana, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa, de polietileno (PE), de politetrafluoroetileno (PTFE), de polipropileno (PP), de acetato de celulosa (CA), de poliacrilonitrilo (PAN), de poliimida (PI), de polisulfona (PS), de polietersulfona (PES) o una
- 60 membrana inorgánica que comprende óxido de aluminio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) y/u óxido de ZIRCONIO (ZrO<sub>2</sub>).
- (iii) la primera región comprende una zona de aplicación de muestra, en la que opcionalmente la zona de aplicación de muestra comprende una almohadilla de aplicación de muestra; o
- (iv) el soporte de la primera región comprende una zona de inmovilización que comprende el oligonucleótido de inmovilización directa o indirectamente unido, en el que opcionalmente, la zona de inmovilización
- 65 comprende fibras tejidas o no tejidas, en el que opcionalmente las fibras no tejidas se seleccionan de fibras



de celulosa, fibras de vidrio, fibras de carburo de silicio, fibras poliméricas, fibras animales (por ejemplo, lana, seda), fibras de carbono, fibras minerales y/o microfibras.

6. Aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la primera región se proporciona corriente arriba de la región adicional, opcionalmente en la que la región adicional comprende una zona de captura en la que el oligonucleótido de captura está directa o indirectamente unido al soporte en el que opcionalmente la región adicional comprende una pluralidad de zonas de captura, comprendiendo cada zona de captura un oligonucleótido de captura directa o indirectamente unido al soporte, en el que cada oligonucleótido de captura puede ser el mismo o puede ser diferente.

7. Aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que:

(i) el aparato comprende además una zona de control localizada corriente abajo de la primera región, en el que la zona de control comprende un oligonucleótido de captura adicional, en que opcionalmente el aparato comprende una pluralidad de zonas de control, comprendiendo cada zona de control un oligonucleótido de captura, en el que cada oligonucleótido de captura es igual o diferente, opcionalmente en el que cada oligonucleótido de captura en las respectivas zonas de control está configurado para unirse a una molécula diferente; y/o

(ii) el aparato comprende además una cubierta que encierra la primera región y la región adicional, en la que opcionalmente, la cubierta puede comprender además un puerto de introducción de muestra, y además opcionalmente, en la que la cubierta comprende además una ventana adyacente a la zona de detección y opcionalmente la zona de control.

8. Aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el soporte de la primera región y/o la región adicional se selecciona independientemente de una perla, una microtitulación u otra placa de ensayo, una tira, una membrana, una película, un gel, un chip, una micropartícula, una nanopartícula, una nanofibra, un nanotubo, una micela, un microporo, un nanoporo y una superficie biosensora, en el que opcionalmente, la primera región está comprendida en un primer recipiente y la región adicional está comprendida en un recipiente adicional.

9. Aparato de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la fase sólida de la primera región y la región adicional están comprendidas en una tira, en el que opcionalmente, la tira comprende además una trayectoria de flujo entre la primera región y la región adicional. opcionalmente que comprende además uno o más de los siguientes:

- a) una almohadilla de absorbancia,
- b) una membrana, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa;
- c) una o más moléculas competidoras; y
- d) una o más moléculas de control.

10. Aparato de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende además un recipiente configurado para acomodar al menos una porción del extremo de la tira y la muestra, en el que el opcionalmente el recipiente comprende una región de introducción de muestra.

11. Aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que:

(i) el oligonucleótido de inmovilización y/o el oligonucleótido de captura se selecciona de una molécula de ADN, una molécula de ARN, una molécula mixta de ADN/ARN, una molécula de ADN modificada y una molécula de ARN modificada;

(ii) que comprende una pluralidad de oligonucleótidos de inmovilización, una pluralidad de oligonucleótidos de captura y una pluralidad de moléculas de ácido nucleico;

(iii) la molécula de ácido nucleico es un aptámero y se selecciona opcionalmente de un aptámero de doble hebra, un aptámero de hebra sencilla y un aptámero que es de doble hebra sobre al menos una porción de su longitud; y/o

(iv) la molécula de ácido nucleico y/o la molécula de inmovilización comprenden una etiqueta detectable,

en la que opcionalmente la etiqueta detectable se selecciona de un fluoróforo, una nanopartícula, un punto cuántico, una enzima, un isótopo radiactivo, una porción de secuencia predefinida, una biotina, una destiobiotina, un grupo tiol, un grupo amina, una azida, un grupo aminoalilo, una digoxigenina, un anticuerpo, un catalizador, una partícula metálica coloidal, una partícula coloidal no metálica, un polímero orgánico, una partícula de látex, una nanofibra, un nanotubo, un dendrímero, una proteína y un liposoma y

además, opcionalmente en la que la etiqueta detectable es una enzima, y en la que dicha enzima se selecciona de peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, ureasa y  $\beta$ -galactosidasa.

12. Aparato de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que:

- 5 (i) la muestra es una muestra biológica seleccionada de sangre total, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aliento, orina, semen, saliva, fluido meningeal, fluido amniótico, fluido glandular, fluido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, fluido sinovial, aspirado de articulación, células, un extracto celular, heces, tejido, una biopsia de tejido y líquido cefalorraquídeo;
- 10 (ii) la muestra se deriva de un producto o subproducto agrícola o industrial, una muestra ambiental, agua, un producto alimenticio, una muestra de un proceso de producción, un producto animal, un producto vegetal y un producto bacteriano; y/o
- (iii) la molécula diana se selecciona de una molécula pequeña orgánica o inorgánica, una célula, una proteína, un péptido, un aminoácido, un carbohidrato, un lípido, un virus, un microorganismo, una sección de tejido, un ion, un nucleótido, un derivado de nucleótido y un ácido nucleico.

13. Un método para detectar la presencia, ausencia o cantidad de una molécula diana en una muestra, el método comprende:

- 15 a) hacer interactuar una muestra con un complejo que comprende:
- 20 i) un oligonucleótido de inmovilización; y
- ii) una molécula de ácido nucleico, en la que el oligonucleótido de inmovilización está unido directa o indirectamente a un soporte, comprendiendo el oligonucleótido de inmovilización una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico y en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse a una porción del oligonucleótido de inmovilización;
- 25 en la que la molécula de ácido nucleico tiene una afinidad de unión a una molécula diana, y además en la que la molécula de ácido nucleico está configurada para formar un complejo con la molécula diana;
- b) si la molécula diana está presente en la muestra, disociar la molécula de ácido nucleico del complejo con el oligonucleótido de inmovilización para formar un complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico; y
- 30 c) proporcionar un oligonucleótido de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico es capaz de hibridarse a una porción del oligonucleótido de captura; y
- d) detectar la presencia o ausencia de la molécula diana.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además si una molécula diana está presente en la muestra, formar un complejo molécula diana-molécula de ácido nucleico-oligonucleótido de captura,
- 35 opcionalmente en el que el método comprende además cuantificar la cantidad de molécula diana en la muestra y/o en el que la detección de la molécula diana comprende detección fotónica, detección electrónica, detección acústica, detección electroquímica, detección electroóptica, detección enzimática, detección química, detección bioquímica o detección física.

- 40 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 a 14, en el que el paso (a) se realiza bajo condiciones eficaces para permitir la unión entre la molécula diana y la molécula de ácido nucleico,
- opcionalmente en el que, el paso de detectar la presencia o ausencia de la molécula diana comprende detectar la hibridación de la molécula de ácido nucleico al oligonucleótido de captura.

45

50

55

60

65

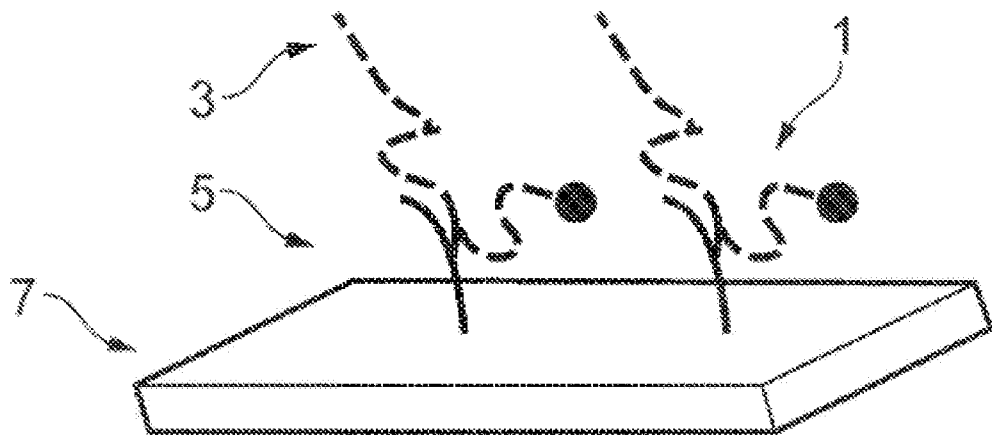


FIG. 1

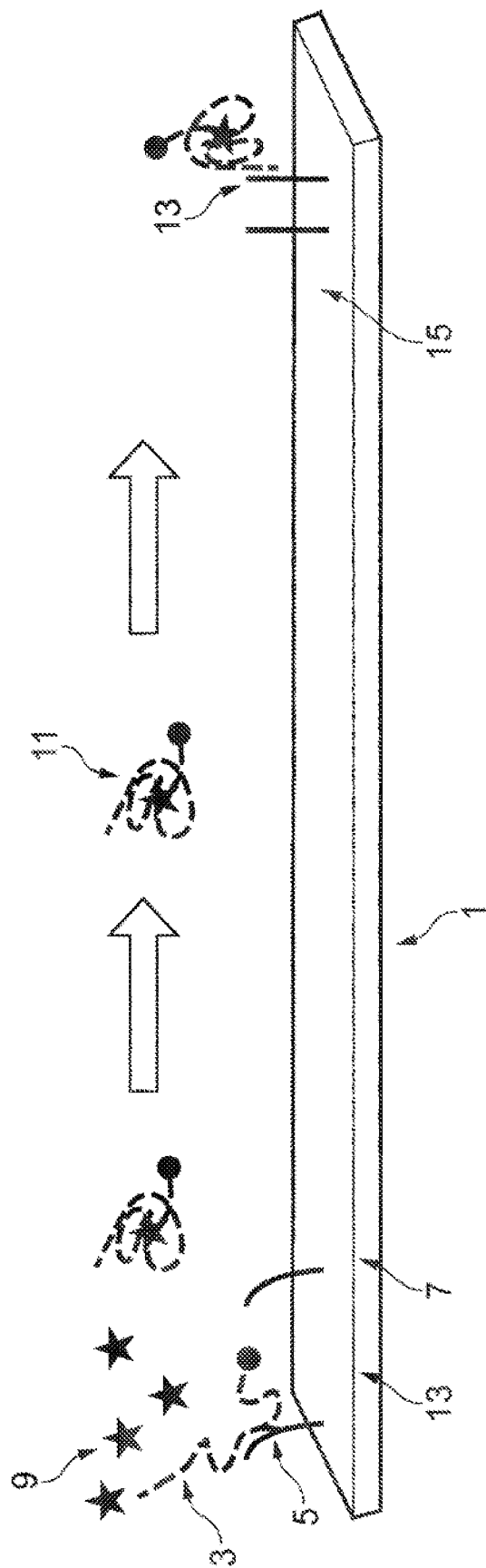


FIG. 2

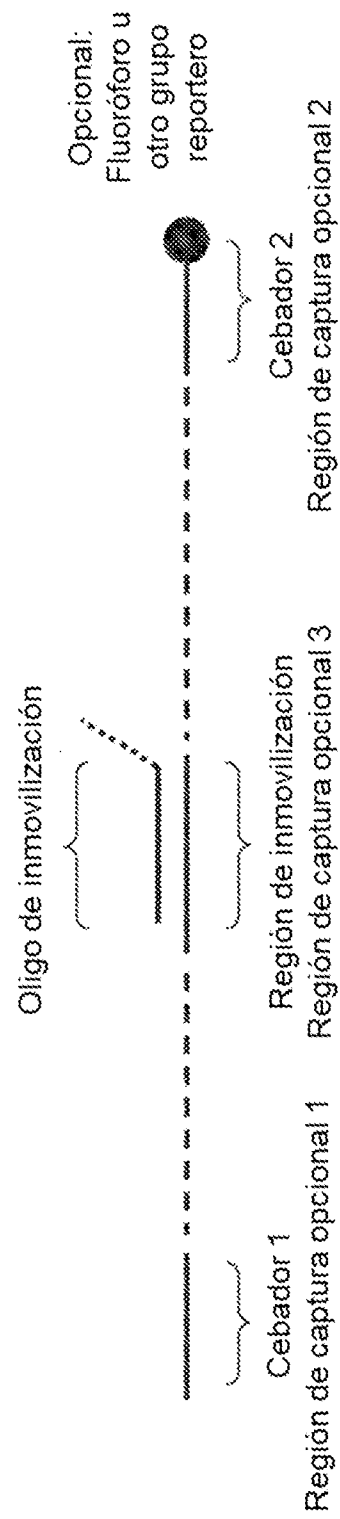


FIG. 3

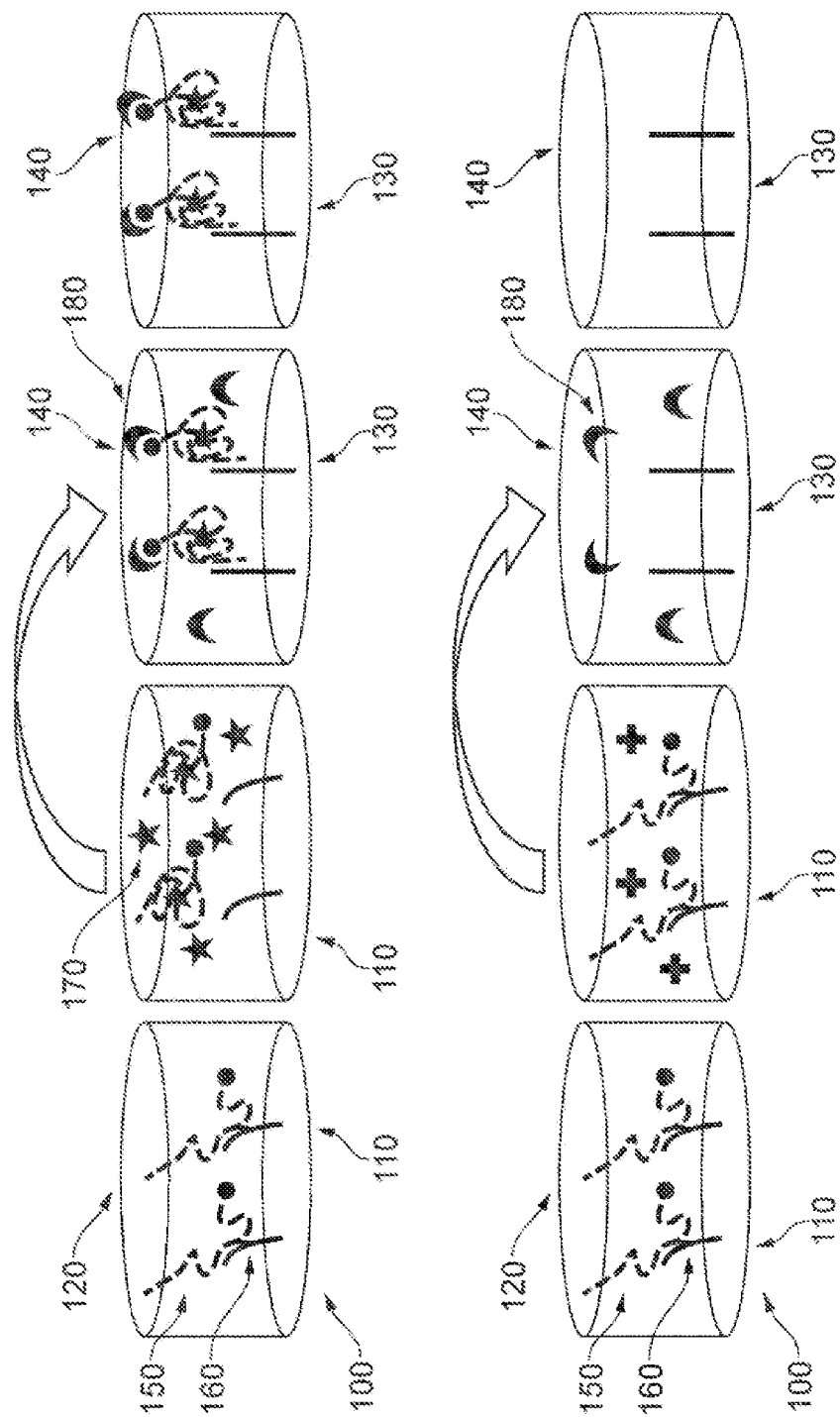


FIG. 4

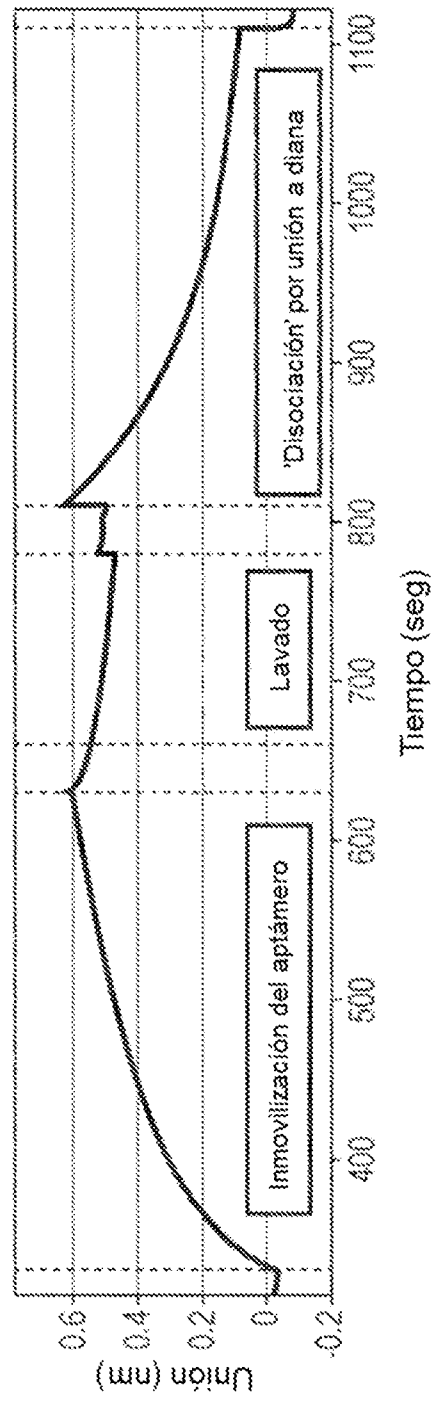


FIG. 5

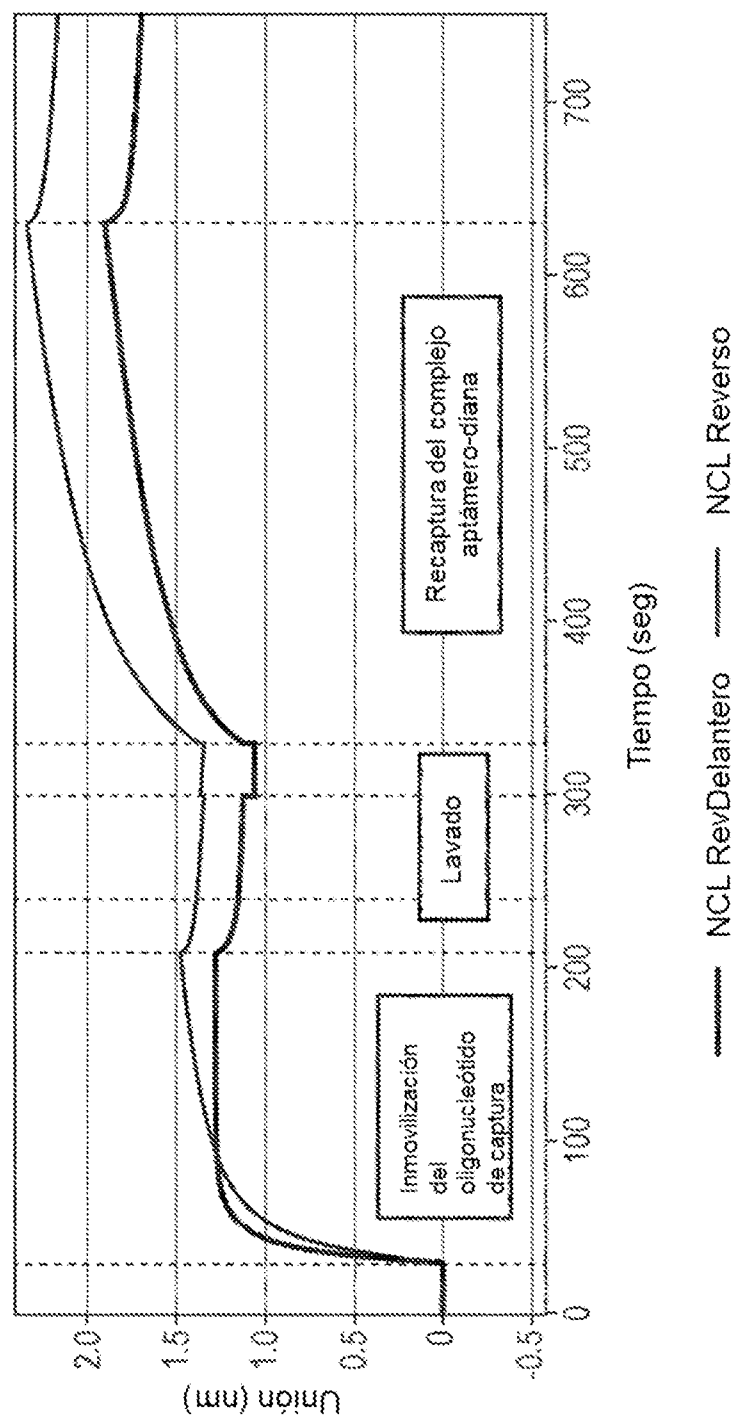


FIG. 6



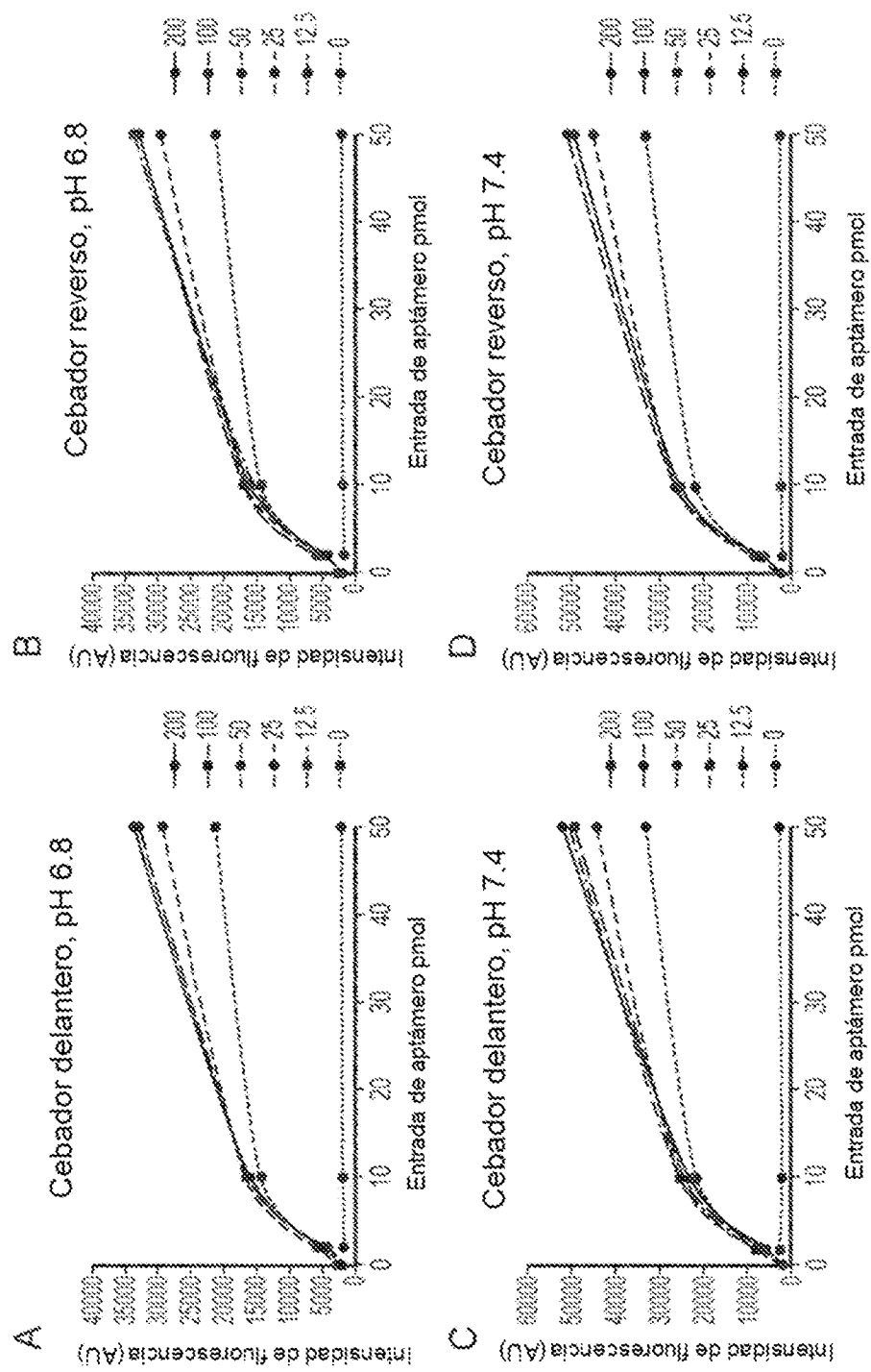


FIG. 7

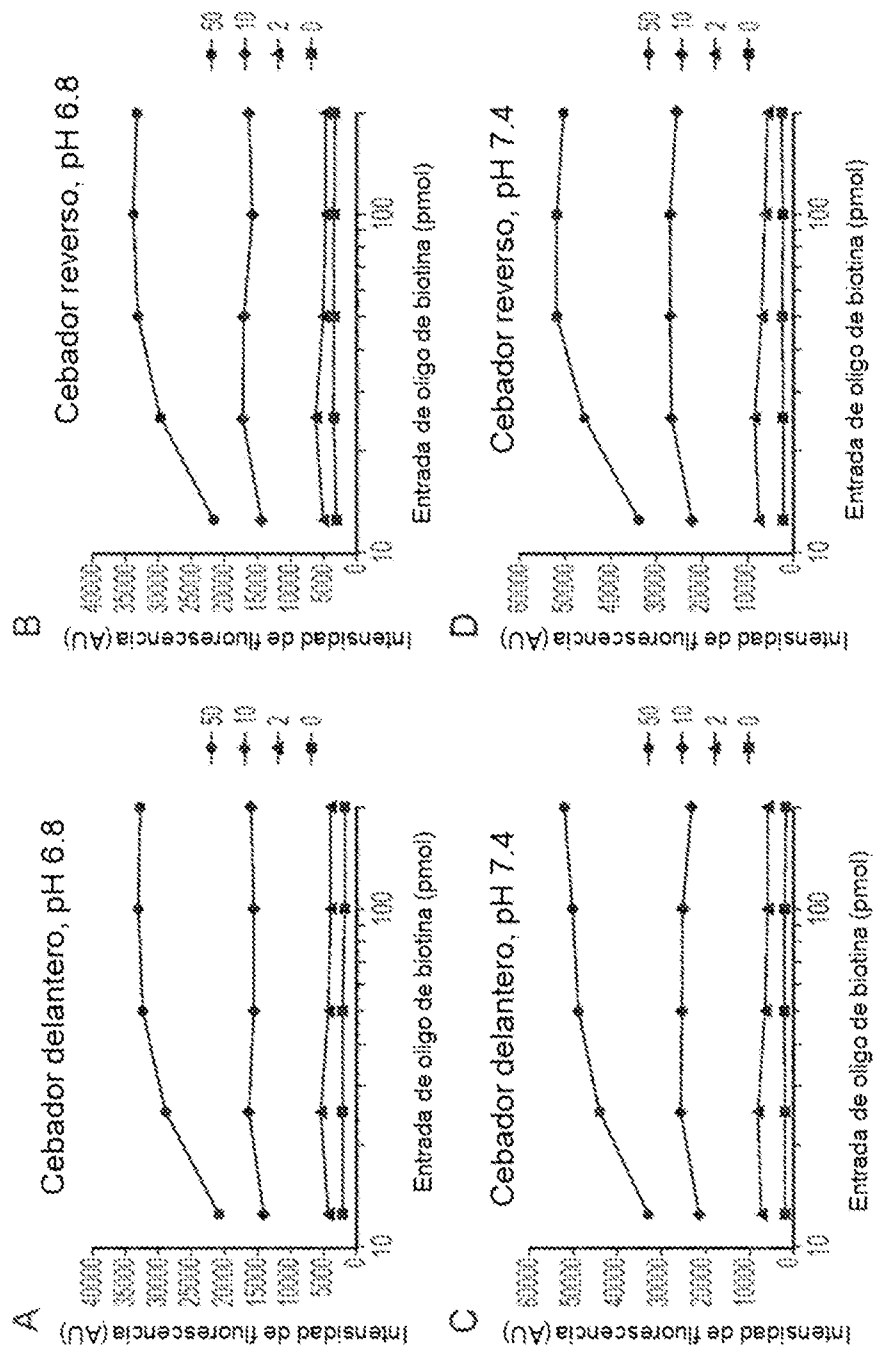
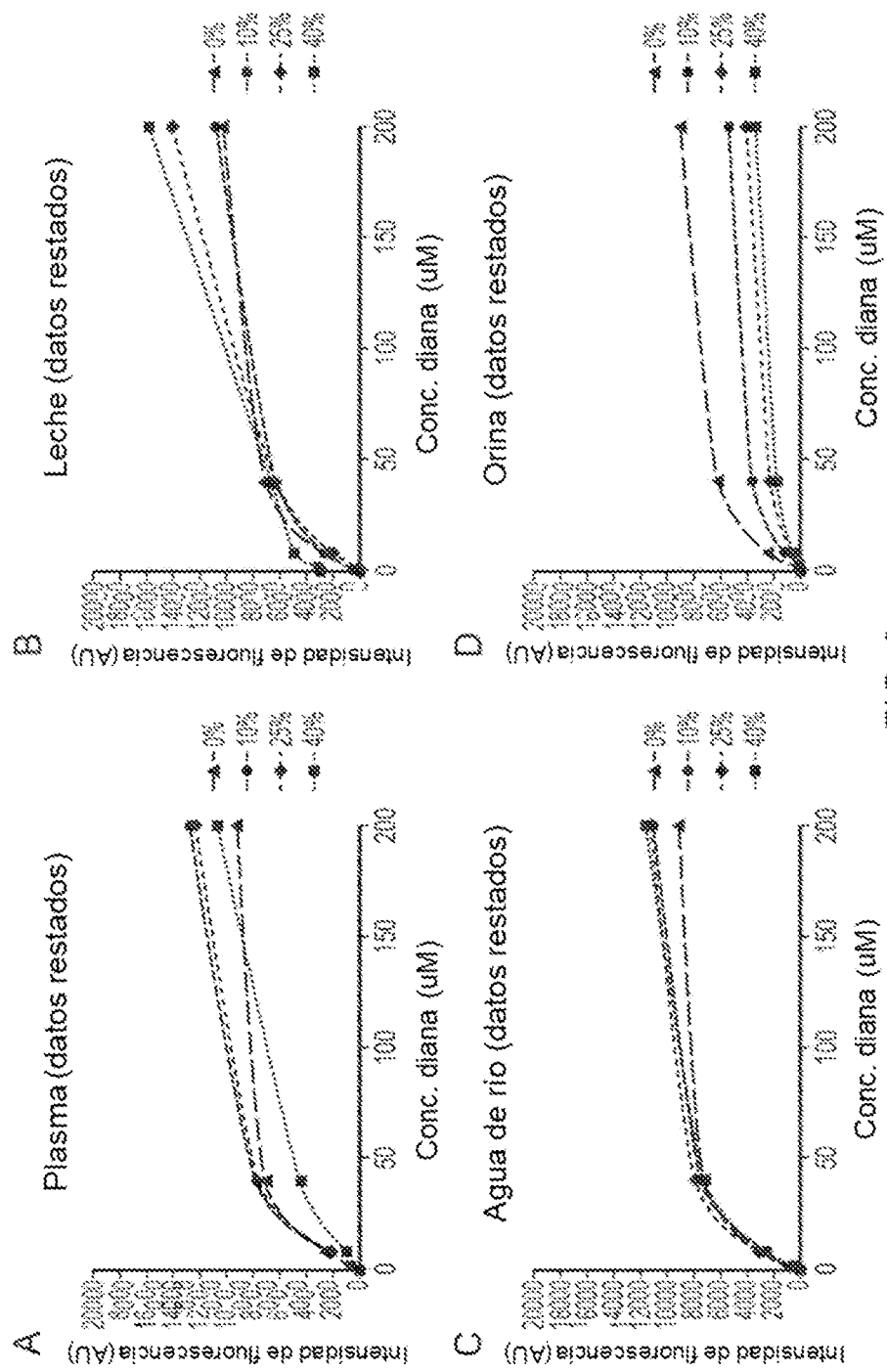


FIG. 8



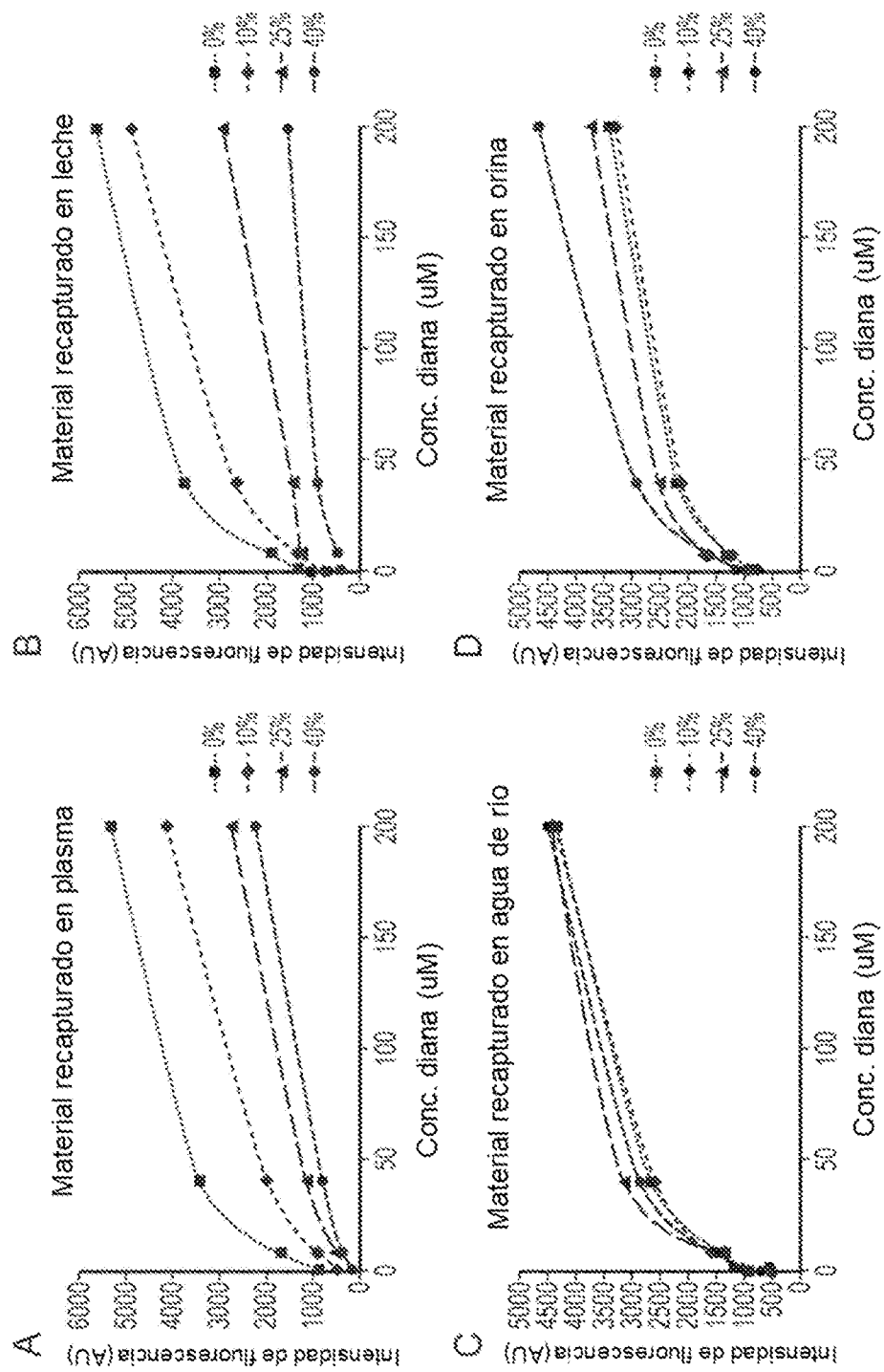


FIG. 10

