

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 711**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2008 E 12160299 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2489743**

54 Título: **Aptámeros con uridinas 5-(N-naftil)-sustituidas**

30 Prioridad:

17.07.2007 US 950283 P
17.07.2007 US 950281 P
17.07.2007 US 950293 P
26.02.2008 US 31420 P
08.05.2008 US 51594 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZICHI, DOMINIC;
WILCOX, SHERI K.;
BOCK, CHRIS;
SCHNEIDER, DANIEL J.;
EATON, BRUCE y
GOLD, LARRY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 533 711 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

Aptámeros con uridinas 5-(N-naftil)-sustituídas

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere, en general, a métodos para la generación de aptámeros y fotoaptámeros que tienen propiedades mejoradas y a los aptámeros y fotoaptámeros mejorados generados de este modo. En particular, la presente divulgación describe aptámeros de velocidad de disociación baja que son muy específicos de una diana de interés. La divulgación describe la composición de estos aptámeros de velocidad de disociación lenta, así como métodos para su selección. Adicionalmente, la divulgación describe construcciones de aptámeros con funcionalidades mejoradas para métodos de detección. Adicionalmente, la divulgación describe aplicaciones posibilitadas por estos aptámeros mejorados.

15 Antecedentes

La siguiente descripción proporciona un resumen de la información relevante a la presente divulgación y no es una concesión de que cualquier información proporcionada o publicaciones citadas en el presente documento sea técnica anterior de la invención reivindicada.

El proceso SELEX es un método para la selección *in vitro* de moléculas de ácido nucleico que pueden unirse con una especificidad elevada a las moléculas diana y se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands" y la patente de EE.UU. Nº 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulada "Nucleic Acid Ligands". Estas patentes, en conjunto citadas en el presente documento patentes SELEX, describen métodos para fabricar un aptámero para cualquier molécula diana deseada.

El proceso SELEX básico se ha modificado para alcanzar un número de objetivos específicos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.707.796, titulada "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure," describe el uso del proceso SELEX junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales, tales como AND doblado. La patente de EE.UU. Nº 5.580.737, titulada "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine," describe un método para identificar aptámeros altamente específicos capaces de discriminar entre moléculas estrechamente relacionadas, denominado Counter-SELEX. La patente de EE.UU. Nº 5.567.588, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX," describe un método basado en SELEX que alcanza un reparto altamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen una afinidad alta y baja por una molécula diana. La patente de EE.UU. Nº 5.496.938, titulada "Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev," describe métodos para obtener aptámeros mejorados después de realizar un SELEX. La patente de EE.UU. Nº 5.705.337, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX," describe métodos para la unión covalente de un aptámero a su diana.

El proceso SELEX abarca la identificación de aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando, tal como características de estabilidad *in vivo* mejorada o de liberación mejorada. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de la ribosa y/o el fosfato y/o la base. Aptámeros identificados por el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides," que describe oligonucleótidos que contienen derivados nucleotídicos modificados químicamente en las posiciones 5'- y 2'-de las pirimidinas. La patente de EE.UU. Nº 5.580.737, *véase anteriormente*, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F), y/o 2'-O-metilo (2'-OMe).

Otras modificaciones del proceso SELEX se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.763.177, la patente de EE.UU. Nº 6.001.577 y la patente de EE.UU. Nº 6.291.184, cada una de las cuales se titula "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX;" véase también, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.458.539 titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands". Estas patentes, en conjunto denominadas en el presente documento "las patentes de PhotoSELEX" describe varios métodos SELEX para seleccionar aptámeros que contienen grupos funcionales fotorreactivos capaces de unirse y/o fotorreticular y/o fotoinactivar una molécula diana. Los aptámeros fotorreactivos resultantes se denominan aptámeros fotorreticulantes o fotoaptámeros.

Aunque estos procesos SELEX y photoSELEX son útiles, siempre existe la necesidad de procesos que conduzcan a propiedades mejoradas de aptámeros generados con técnicas de selección *in vitro*. Por ejemplo, existe la necesidad de aptámeros para las moléculas diana con afinidades de unión mejores que los obtenidos con los nucleótidos ADN o ARN de origen natural, así como métodos para producir dichos aptámeros. Para muchas aplicaciones, tal como, por ejemplo, ensayos *in vitro*, aplicaciones diagnósticas, terapéuticas o de imagen, es de interés producir aptámeros con velocidades de disociación lentas del complejo de afinidad aptámero/diana. Se han propuesto varias técnicas para producir dichos reactivos (véanse, por ejemplo, los documentos WO99/27133 y US2005/0003362). No

obstante, estos procesos de selección no discriminan entre la selección de reactivos que tienen cinéticas de asociación rápida con la diana (es decir, velocidades de asociación rápidas) y la selección de reactivos que tienen cinéticas de disociación lentas con la diana (es decir, velocidades de disociación lentas). Por tanto, existe la necesidad de nuevos procesos y técnicas que favorezcan la selección de aptámeros de velocidad de disociación

lenta al tiempo que inhiban la selección de aptámeros que simplemente tengan una velocidad de asociación rápida con la diana.

Latham et al. (Nucleic Acids Research Special Publication (1994), 22(14):2817-2822) divulgan aptámeros que se pueden obtener mediante procedimientos SELEX que incorporan pirimidinas modificadas en su posición 5, es decir 5-(1-pentilil)-2'-deoxiuridina.

Por último, existe la necesidad de construcciones de aptámeros que incluyen diferentes funcionalidades integradas. Estas funcionalidades pueden incluir marcadores de inmovilización, marcadores de detección, medios para estimular o controlar la separación etc.

Sumario

La presente divulgación describe nuevos aptámeros y métodos para producir y usar dichos aptámeros. En particular, la divulgación describe aptámeros de velocidades de disociación lentas (velocidad de disociación lenta), aptámeros de velocidad de disociación lenta que contienen pirimidinas modificadas en C-5 y procesos para la selección de aptámeros de velocidad de disociación lenta mediante dilución, mediante la adición de un competidor o mediante una combinación de ambos abordajes. Además se describen aptámeros de velocidad de disociación lenta a varias dianas tales como proteínas y péptidos. También se describen aptámeros de velocidad de disociación lenta con características estructurales y temperaturas de fusión únicas. La divulgación también describe aptámeros de velocidad de disociación lenta con grupos funcionales fotorreactivos, aptámeros que son resistentes a la presencia de materiales polianiónicos y un proceso de selección para estos aptámeros, así como aptámeros contruidos con otras diversas funcionalidades para mejorar su utilidad en varias aplicaciones.

La presente divulgación describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que son capaces de unirse a moléculas diana. Más específicamente, la presente divulgación describe métodos para producir aptámeros y/o fotoaptámeros que tienen velocidades de disociación más lentas de sus respectivas moléculas diana que los aptámeros y/o fotoaptámeros obtenidos con los métodos SELEX anteriores. En general, después de poner en contacto la mezcla candidata con la molécula diana y permitir la formación de complejos de ácido nucleico-diana, se introduce un proceso de enriquecimiento a velocidad de disociación lenta en el que los complejos ácido nucleico-diana con velocidades de disociación rápidas se disociarán y no se volverán a formar, mientras que los complejos con velocidades de disociación lentas permanecerán intactos. Los métodos para introducir un proceso de enriquecimiento a velocidad de disociación lenta incluyen, entre otros, añadir moléculas competidoras a la mezcla de ácidos nucleicos y moléculas diana, diluir la mezcla de ácidos nucleicos y moléculas diana o una combinación de ambos. La divulgación describe además aptámeros y fotoaptámeros obtenidos usando estos métodos.

En una disposición, el método comprende preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; poner en contacto la mezcla candidata con una molécula diana en la que los ácidos nucleicos con las afinidades relativas más altas por la molécula diana se unen preferentemente a la molécula diana, formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; introducir un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para inducir la disociación de los complejos de ácido nucleico-molécula diana con velocidades de disociación relativamente rápidas; repartir los complejos ácido nucleico-molécula diana unidos restantes de los ácidos nucleicos libres en la mezcla candidata; e identificar los ácidos nucleicos unidos a la molécula diana. El proceso puede además incluir la etapa repetida de amplificar los ácidos nucleicos que se unen a la molécula diana para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ácidos nucleicos que se unen a la molécula diana y producir todavía complejos de ácido nucleico-molécula diana que tienen velocidades de disociación lentas.

En otra disposición, la mezcla candidata de ácidos nucleicos incluye ácidos nucleicos que contienen bases nucleotídicas modificadas que pueden ayudar a la formación de complejos de ácidos nucleicos modificados-diana que tienen velocidades de disociación lentas. En la solicitud de EE.UU. Nº de serie 12/175,388, presentada el 17 de julio de 2008 y titulada "Improved SELEX and PHOTOSELEX" que se está presentado a la vez con la presente solicitud se divulgan métodos mejorados para realizar SELEX con nucleótidos modificados, incluyendo nucleótidos que contienen grupos fotoactivos u otros funcionales, o nucleótidos que contienen soportes para grupos fotoactivos. Los nucleótidos soporte también se pueden usar para la introducción media-SELEX o post-SELEX de nucleótidos modificados que no son fotorreactivos.

Los diversos métodos y etapas descritos en el presente documento se pueden usar para generar un aptámero capaz de (1) unirse a una molécula diana o (2) unirse a una molécula diana y formar después un enlace covalente con la molécula diana tras la irradiación con luz en el espectro UV o de luz visible.

Los diversos métodos y etapas descritos en el presente documento se pueden usar para generar un aptámero capaz de modificar la bioactividad de una molécula diana a través de la unión y/o reticulación con la molécula diana. En una realización se identifica un aptámero de una molécula diana única asociada con o relevante a un proceso de

enfermedad específico. Este aptámero se puede usar como reactivo diagnóstico, *in vitro* o *in vivo*. En otra realización, un aptámero de una molécula diana asociado con un estado de enfermedad se puede administrar a un individuo y usar para tratar la enfermedad *in vivo*. Los aptámeros y fotoaptámeros identificados en el presente documento se pueden usar en cualquier técnica diagnóstica, de imagen, de detección de alto rendimiento o de validación de diana, o procedimientos o ensayos para los que se pueden usar aptámeros, oligonucleótidos, anticuerpos y ligandos, sin limitaciones.

Los aptámeros anteriores que no tienen las propiedades de velocidad de disociación lenta de los aptámeros de la presente invención se han usado para diversos fines. En casi todos estos casos, los aptámeros de velocidad de disociación lenta tendrán un mejor funcionamiento con respecto a los aptámeros no seleccionados para que no tengan propiedades de velocidad de disociación lenta.

El aptámero Macugen® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.168.778; la patente de EE.UU. Nº 6.051.698; la patente de EE.UU. Nº 6.426.335 y la patente de EE.UU. Nº 6.962.784) se ha aprobado para el tratamiento de la degeneración macular y funciona debido a su afinidad específica por VEGF. Se han estudiado otros aptámeros y/o están en desarrollo para su uso como agentes terapéuticos. Los aptámeros no seleccionados para que tengan propiedades de velocidad de disociación lenta se han usado en muchas aplicaciones diagnósticas y de imagen (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.843.653; la patente de EE.UU. Nº 5.789.163; la patente de EE.UU. Nº 5.853.984; la patente de EE.UU. Nº 5.874.218; la patente de EE.UU. Nº 6.261.783; la patente de EE.UU. Nº 5.989.823; la patente de EE.UU. Nº 6.177.555; la patente de EE.UU. Nº 6.531.286), detección de alto rendimiento (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.329.145; La patente de EE.UU. Nº 6.670.132; la patente de EE.UU. Nº 7.258.980) y en los kits de PCR (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.183.967; la patente de EE.UU. Nº 6.020.130; la patente de EE.UU. Nº 5.763.173; la patente de EE.UU. Nº 5.874.557; La patente de EE.UU. Nº 5.693.502.) Los aptámeros de velocidad de disociación lenta de esta divulgación se pueden usar en cualquier técnica diagnóstica, terapéutica, de imagen o cualquier otro uso para el cual se han usado los anticuerpos, aptámeros y pares de unión a ligando.

La divulgación proporciona aptámeros y fotoaptámeros identificados por los métodos mejorados divulgados en el presente documento, kits diagnósticos que incluyen dichos aptámeros y fotoaptámeros, y usos terapéuticos y diagnósticos de dichos aptámeros y fotoaptámeros. Los nuevos aptámeros y fotoaptámeros de velocidad de disociación lenta identificados usando los métodos descritos se pueden usar en diversos ensayos, incluyendo ensayos que usan matrices planas, esferas y otros tipos de soportes sólidos. Los ensayos se pueden usar en diversos contextos, incluyendo en aplicaciones para investigación en ciencias de la vida, aplicaciones de diagnóstico clínico (por ejemplo, una prueba diagnóstica para una enfermedad o una prueba de "bienestar" para salud preventiva); ensayos ALONA y UPS y aplicaciones de obtención de imágenes *in vivo*. Para algunas aplicaciones se pueden usar ensayos multiplexados que usan los aptámeros y fotoaptámeros descritos.

En algunas realizaciones, los aptámeros (o fotoaptámeros) de velocidad de disociación lenta descritos en el presente documento se pueden usar como agentes de contraste intravenoso u oral para TAC y otras aplicaciones de imagen. Las TAC se usan en el diagnóstico de trastornos musculares y óseos, localización de coágulos sanguíneos, detección de hemorragias internas, control de enfermedades tales como cáncer etc. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden marcar con un componente para barrido de TAC detectable, tal como, por ejemplo, yodo, bario o gastrografina. Además de transportar el componente detectable, el aptámero se puede diseñar para dirigir dicho componente a un tejido específico o diana deseada. El aptámero puede servir para concentrar o localizar el componente detectable y, de este modo, mejorar la proporción señal – ruido aumentando la señal disponible. Dado que la velocidad de disociación del aptámero puede ser lo bastante baja, la duración del barrido se puede aumentar y se puede mejorar la proporción señal-ruido del barrido. La especificidad del aptámero por la diana también puede mejorar la proporción señal-ruido en estas aplicaciones de imagen.

En una realización, el aptámero de velocidad de disociación lenta se marca con un material diamagnético o paramagnético. En esta realización, el aptámero marcado se puede usar para mejorar el rendimiento de la obtención de imágenes por resonancia magnética (RM). La RM es particularmente adecuada para la obtención de imágenes de áreas y tejidos pequeños selectivos con un elevado contenido de agua o para vigilar el flujo sanguíneo. La especificidad de los aptámeros de velocidad de disociación lenta puede mejorar la localización del reactivo para RM en una sección de tejido deseada. De un modo similar, los aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden modificar con materiales tales como flúor, carbono 11, oxígeno 15 o nitrógeno 13 para su uso en pruebas PET. En otra realización, los aptámeros se pueden marcar con materiales activos en IR que se pueden usar para la obtención de imágenes en infrarrojos. También se contempla que los aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden marcar para su uso con otras modalidades de obtención de imagen.

En una realización, los aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden usar como un reactivo muy sensible y específico para la incorporación en diversos métodos o kits diagnósticos *in vitro*. En algunas realizaciones, los aptámeros de velocidad de disociación lenta se usan como sustitutos de anticuerpos en una serie de métodos de detección de enfermedades infecciosas o de otro tipo en los que el aptámero de la diana de interés incluye un material detectable o un componente de inmovilización o captura o ambos. En estas realizaciones, después de mezclar el aptámero del kit con una muestra clínica se pueden usar diversos formatos de ensayo. En una

realización, el aptámero también incluye un marcador detectable, tal como un fluoróforo. En otras realizaciones, el formato de ensayo puede incluir inactivación por fluorescencia, métodos de hibridación, citometría de flujo, espectroscopia de masas, métodos de inhibición o competición, ensayos de oligonucleótidos ligados a enzima, SPR, métodos de onda evanescente etc. En algunas realizaciones, el aptámero se proporciona en el kit en solución. En otras realizaciones, el aptámero en el kit se inmoviliza sobre un soporte sólido usado junto con el ensayo para analizar la muestra. En diversas realizaciones, el soporte sólido está diseñado para la detección de una o más dianas de interés. En otras realizaciones, el kit puede incluir además reactivos para extraer la diana de interés, reactivos para amplificar el aptámero, reactivos para realizar lavados, reactivos de detección etc.

En otra realización, los aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden usar en estudios de obtención de imágenes terapéuticas. Durante el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos, a menudo es difícil evaluar determinadas características del compuesto, tales como, por ejemplo, biodistribución, la tasa de lavado, la biodisponibilidad, las interacciones fármaco/diana *in vivo*, etc. En muchos casos, si se usó un material detectable adecuado para modificar el compuesto terapéutico se podrían usar estudios de imagen para evaluar todas estas características. Aunque la modificación directa de un compuesto terapéutico con frecuencia inhibe su capacidad para interactuar con su diana y, por tanto, reduce la eficacia, un tamaño pequeño del aptámero y una especificidad adaptable lo hacen potencialmente bien adecuado para reaccionar con un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo u otra terapéutica basada en proteínas) al tiempo que se minimizan cualquier efecto indeseable sobre la eficacia terapéutica del compuesto. Para evaluar características tales como la biodistribución y la tasa de lavado, el complejo aptámero/terapéutico puede sobrevivir durante un periodo de tiempo prolongado. Estos tipos de estudios se pueden simplificar en los casos en los que el compuesto terapéutico es un aptámero de velocidad de disociación lenta. En varias realizaciones, los aptámeros usados en aplicaciones terapéuticas, de imagen y diagnósticas pueden incluir varias modificaciones, tales como, por ejemplo, 2'-fluoro y otras modificaciones, para aumentar la estabilidad del aptámero tras la exposición a varios componentes que pueden estar presentes en una muestra de prueba o *in vivo*, tales como, por ejemplo, nucleasas y otros componentes de la muestra o de fluidos corporales.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1A ilustra un método SELEX de ejemplo y la FIG. 1B ilustra un método SELEX de ejemplo que incluye la etapa de incorporar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta o proceso.

La FIG. ilustra secuencias oligonucleotídicas representativas del molde del aptámero, el cebador y complementarias usadas en la divulgación. Los oligonucleótidos se prepararon mediante técnicas convencionales de síntesis en fase sólida. B=dT-biotina.

La FIG. 3 ilustra histogramas de las constantes de disociación para los aptámeros de afinidad seleccionados sin (A) y con (B) un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta como se describe en el ejemplo 2.

Las FIGS. 4A y B muestran oligonucleótidos que se usaron para preparar las mezclas candidatas o realizar varias etapas en el proceso de selección descrito en los Ejemplos 3 y 4. Los oligonucleótidos se prepararon mediante técnicas convencionales de síntesis en fase sólida. En este ejemplo se usaron dos secuencias de mezcla candidata, denominadas 1 y 2. B = dT-biotina. Los cromóforos BrdU (5-bromo-dUTP), Antraquinona (AQ) y psoraleno (Psor) se adquirieron como fosforoamiditas y se añadieron al extremo 5' del cebador directo durante la síntesis. Se preparó 4-azido-2-nitro-anilina (ANA) como un derivado de carbonato de paranitro-fenilo y se acopló a una hexilaminafosforoamidita en 5' tras la síntesis. En este ejemplo se usaron dos secuencias de mezcla candidata, denominadas 1 y 2. (A) El molde 1 se usó con las mezclas candidatas que contenían 5'- BrdU, AQ y ANA, y (B) el molde 2 se usó con las mezclas candidatas que contienen 5'- Psor.

La FIG. 5 ilustra las estructuras químicas de los cromóforos acoplados al extremo 5' del cebador directo como se ilustra en las FIGS. 4A y 4B.

La FIG. 6 ilustra un análisis PAGE de la actividad de reticulación de la biblioteca enriquecida TIMP-3 5'ANA/BzdU usando PhotoSELEX fijado en 5' descrito en el ejemplo 3. El gel ilustra la separación del aptámero libre ((A_f), el aptámero reticulado intramolecular (A_f^{*}) y los complejos proteína:aptámero reticulados (P:A).

La FIG. 7 es un gráfico de más de 500 dianas para las que se han identificado aptámeros de velocidad de disociación lenta.

Las FIGS 8A a 8D ilustran construcciones de aptámeros que contienen diversas funcionalidades diferentes y opcionales que incluyen marcadores de inmovilización, marcadores, restos de fotoreticulación, espaciadores y restos liberables.

Las FIGS. 9A a 9F ilustran ejemplos de construcciones de aptámero que incluyen un elemento escindible o liberable, un marcador (por ejemplo, biotina), un espaciador y un marcador (por ejemplo Cy3).

La FIG. 10 ilustra las construcciones de aptámeros y cebadores descritas en la divulgación. Cy3 representa un pigmento de Cianina 3, PC un enlazador fotoescindible, ANA un grupo de reticulación fotoreactivo, (AB)₂ un par de residuos de biotina separados por residuos dA y (T)₈ un enlazador de poli dT. Las construcciones de cebadores son complementarias a la región fijada en 3' completa de las construcciones de aptámero.

Las FIGS. 11A a 11C ilustra las curvas de respuesta a la dosis para aptámeros de velocidad de disociación lenta frente a los aptámeros tradicionales para tres dianas diferentes.

Las FIGS. 12A y 12B ilustran curvas de rendimiento para un aptámero de velocidad de disociación lenta en el que la diana era un péptido.

La FIG. 13 ilustra un gráfico de la temperatura de fusión medida de una serie de aptámeros de velocidad de disociación lenta respecto a la temperatura de fusión predicha.

La FIG. 14 describe las modificaciones de la base de nucleótidos incluidos en esta divulgación. Los grupos R que se pueden usar se describen además de los enlazadores (X) que se pueden usar entre el punto de unión al nucleótido y el grupo R. Las posiciones para la modificación de los nucleótidos también se indican.

La FIG. 15 ilustra un gráfico usado en la determinación de la constante de unión para un aptámero que contiene pirimidinas modificadas en C-5.

Descripción detallada

La práctica de la práctica de la invención divulgada en el presente documento emplea, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante, dentro del nivel de experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (edición actual); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., edición actual); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames y S. Higgins, eds., edición actual); *Transcription and Translation* (B. Hames y S. Higgins, eds., edición actual).

Todas las publicaciones, documentos de patente publicados y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia en la o las técnicas a las que pertenece la invención.

Como se usa en esta memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario, y se usan de forma intercambiable con al “al menos uno/a” y “uno/a o más”. Por tanto, la referencia a “un aptámero” incluye mezclas de aptámeros, la referencia a “una sonda” incluye mezclas de sondas y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” representa una modificación o variación insignificante de los valores numéricos de forma que la función básica del elemento al que se refiere el valor numérico no se modifica.

Como se usa en el presente documento, con los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “contiene”, “que contiene” y cualquier variación de los mismos, se pretende abarcar una inclusión no exclusiva, de forma que un proceso, método, proceso por producto o composición de materia que comprende, incluye o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solo dichos elemento sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, proceso por producto o composición de materia.

Como se usa en el presente documento, “ligando de ácido nucleico”, “aptámero” y “clon” se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un ácido nucleico de origen no natural que tiene o puede tener una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, entre otras, la unión de la diana, el cambio catalítico de la diana, la reacción con la diana en un modo que modifique o altere la diana o la actividad funcional de la diana, la fijación covalente a la diana (como en un inhibidor suicida) y la facilitación de la reacción entre la diana y otra molécula. En una realización, la acción es la afinidad de unión específica por una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional, aparte de un polinucleótido, que se une al aptámero a través de un mecanismo que es principalmente independiente del apareamiento de Watson/Crick o la unión en triple hélice, en la que el aptámero no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de estar unido por la molécula diana. Los aptámeros incluyen ácidos nucleicos que se identifican en una mezcla candidata de ácidos nucleicos, siendo el aptámero un ligando de una diana dada, mediante el método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la diana respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se pueden repartir a partir del resto de la mezcla candidata; (B) repartir la mayor afinidad y/o ácidos nucleicos de velocidad de disociación lenta a partir del resto de la mezcla candidata; y (c) amplificar los ácidos nucleicos de mayor afinidad para dar una mezcla enriquecida en ligando de ácidos nucleicos, de modo que se identifican los aptámeros de la molécula diana. Está reconocido que las interacciones de afinidad son una cuestión de grado; no obstante, en este contexto, la “afinidad de unión específica” de un aptámero por esta diana significa que el aptámero se une a su diana generalmente con un grado de afinidad mucho mayor que con el que se une a otros componentes que no son diana en una mezcla o muestra. Un “aptámero” o “ligando de ácido nucleico” es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos concreta. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. “Aptámeros” hace referencia a más de uno de estos conjuntos de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. Aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser monocatenarios, bicatenarios o contener regiones de doble cadena.

Como se usa en el presente documento, “velocidad de disociación lenta” o “tasa de disociación lenta” hace referencia al tiempo necesario para que un complejo de aptámeros/diana comience a disociarse. Esto se puede expresar como la semivida, $t_{1/2}$, o el punto en el que el 50 % del complejo aptámero/diana se ha disociado. La velocidad de disociación o tasa de disociación de un aptámero de velocidad de disociación lenta, expresada como los valores $t_{1/2}$, puede ser de aproximadamente ≥ 30 minutos, ≥ 60 minutos, ≥ 90 minutos, ≥ 120 minutos, ≥ 150 minutos, ≥ 180 minutos, ≥ 210 y aproximadamente ≥ 240 minutos.

En una realización, un método para producir una biblioteca sintética de ácidos nucleicos comprende: 1) sintetizar los ácidos nucleicos; 2) desproteger los ácidos nucleicos; 3) purificar los ácidos nucleicos; y 4) analizar los ácidos nucleicos. En la etapa de síntesis se prepara una mezcla de monómeros en la que la proporción de los diversos nucleótidos en la mezcla se optimiza para dar proporciones iguales de cada nucleótido en el producto final. Uno o más de los monómeros en la mezcla pueden comprender un nucleótido modificado. En este procedimiento se usan grupos de protección de amidita y en una realización, la concentración del monómero es de 0.1 M. Durante la síntesis, el grupo protector en cinco prima se conserva en el ácido nucleico producto. La síntesis se realiza sobre un soporte sólido (vidrio de poro controlado, CPG) y al menos aproximadamente 80 ciclos se completan para la síntesis del producto final.

Tras el proceso de síntesis, el producto de ácido nucleico se desprotege. Se usa un tampón acuoso de lisina 1,0 M, a pH 9,0, para escindir los sitios apurínicos mientras que el producto queda retenido en el soporte (vidrio de poro controlado, CPG). Estas secuencias truncadas escindidas se eliminan lavando con agua desionizada (dl) dos veces. En la preparación para la etapa de desprotección se añaden 500 ul de agua dl después de los dos lavados. Esta etapa implica el tratamiento con 1,0 ml de T-butilamina:metanol:agua, 1:1:2 durante 5 horas a 70 °C, seguido de congelación, filtración y evaporación hasta sequedad. El producto ácido nucleico se purifica en base a la hidrofobicidad del grupo protector en una columna PRP-3 HPLC (Hamilton). Las fracciones de la columna adecuadas se recogen y se combinan, se desalan y se evaporan hasta sequedad para eliminar los tampones de elución volátiles. El producto final se lava con agua mediante un proceso de centrifugación y después se resuspende. Por ultimo, el material resuspendido se trata para desproteger el producto final. El producto final se caracteriza mediante la composición en bases, extensión del cebador y secuenciación en gel.

También se puede producir una mezcla candidata de ácidos nucleicos mediante un método enzimático usando una fase sólida. En una realización, este método comprende las mismas etapas básicas descritas anteriormente. En este caso, el objetivo es la síntesis de una biblioteca antisentido y estas bibliotecas se producen con una modificación en 5'-biotina. El resto de los procesos sintéticos son como se ha descrito anteriormente. Una vez que se prepara la biblioteca sintética, los ácidos nucleicos se pueden usar en una mezcla de extensión del cebador que contiene uno o más nucleótidos modificados para producir la mezcla candidata en un método clásico de extensión del cebador.

Los aptámeros se pueden sintetizar mediante la misma química que se usa para la síntesis de una biblioteca. No obstante, en lugar de una mezcla de nucleótidos, se introduce un nucleótido en cada etapa de la síntesis para controlar la secuencia final generada mediante métodos de rutina. Los nucleótidos modificados se pueden introducir en el proceso de síntesis en las posiciones deseadas en la secuencia. Se pueden introducir otras funcionalidades según se desee usando modificaciones químicas conocidas de los nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, "mezcla candidata" es una mezcla de ácidos nucleicos de diferente secuencia a partir de los cuales se selecciona un ligando deseado. La fuente de una mezcla candidata puede ser de ácidos nucleicos de origen natural o fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente o ácidos nucleicos elaborados mediante una combinación de las técnicas anteriores. Los nucleótidos modificados, tales como nucleótidos con grupos fotorreactivos u otras modificaciones, se pueden incorporar en la mezcla candidata. Además, se puede usar un proceso SELEX para producir una mezcla candidata, es decir, se puede usar un primer experimento del proceso SELEX para producir una mezcla enriquecida en ligando de ácidos nucleicos que se usa como la mezcla candidata en un segundo experimento del proceso SELEX. Una mezcla candidata también puede comprender ácidos nucleicos con uno o más motivos estructurales comunes. Como se usa en el presente documento, una mezcla candidata en ocasiones también se denomina "conjunto" o "biblioteca". Por ejemplo, un "conjunto de ARN" hace referencia a una mezcla candidata comprendida por ARN.

Cada ácido nucleico en una mezcla candidata puede tener secuencias fijadas en cualquier lado de una región aleatorizada para facilitar el proceso de amplificación. Los ácidos nucleicos en la mezcla candidata de ácidos nucleicos pueden comprender adicionalmente cada uno regiones fijadas o secuencias de "cola" en sus extremos 5' y 3' para prevenir la formación de parásitos de alto peso molecular durante el proceso de amplificación.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud y dichos nucleótidos pueden incluir desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o análogos o desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos modificados químicamente. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" incluyen moléculas bi o monocatenarias, así como moléculas de triple hélice.

Si están presentes, las modificaciones químicas de un nucleótido pueden incluir, por separado o en cualquier combinación, modificaciones del azúcar en posición 2', modificaciones de la pirimidina en posición 5 (p. ej., 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-[2-(1H-indol-3il)etil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina), modificaciones en la purina en posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo-o 5-yodo-uracilo, modificaciones en la estructura, metilaciones, combinaciones inusuales de pares de bases

tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como protección de los extremos o pegilación. Otras modificaciones pueden incluir la sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos etc.) y aquellos con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos etc.), aquellos que contienen alquilantes y aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos etc.). Adicionalmente, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presente en un azúcar se puede sustituir por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; proteger con grupos protectores convencionales o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH en los extremos 5' y 3' se pueden fosforilar o sustituir con aminas, restos de grupos protectores de extremos orgánicos o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o restos de grupos protectores de extremos orgánicos o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 polímeros de polietilenglicol (PEG) u otros polímeros sintéticos o biológicos hidrófilos o hidrófobos. Si está presente, una modificación en la estructura nucleotídica se puede impartir antes o después del ensamblaje de un polímero. Una secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente tras la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcar, azúcares α -anoméricos tales como arabinosa, xilasas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, pseudoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Como se ha indicado anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster se pueden sustituir con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen realizaciones en las que el fosfato está sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (C 1-20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o aralilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La sustitución de las formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, como lo pueden ser las estructuras de armazón alternativas como una estructura de poliamida.

En una realización, la región variable del aptámero incluye nucleótidos que incluyen bases modificadas. Determinados aptámeros modificados se pueden usar en cualquiera de los métodos, dispositivos y kits descritos. Se ha demostrado que estos nucleótidos modificados producen nuevos aptámeros que tienen velocidades de disociación lentas a partir de sus respectivas dianas al tiempo que mantienen una elevada afinidad por la diana. En una realización, la posición C-5 de las bases de pirimidina se puede modificar. Los aptámeros que contienen nucleótidos con bases modificadas tienen una serie de propiedades que son diferentes a las propiedades de los aptámeros convencionales que incluyen solo los nucleótidos de origen natural (es decir, nucleótidos no modificados). En una realización, el método para la modificación de los nucleótidos incluye el uso de un enlace amida. No obstante se pueden usar otros métodos adecuados para la modificación. Sorprendentemente se ha observado que la estructura de los aptámeros de velocidad de disociación lenta identificados no parece ser completamente de acuerdo con la estructura predicha por los modelos de apareamiento de bases estándar. Esta observación está respaldada por el hecho de que las temperaturas de fusión medidas de los aptámeros de velocidad de disociación lenta no son consistentes con las temperaturas de fusión predichas por los modelos, véase la Fig. 13. Como se ha demostrado, parece que no hay una correlación entre las temperaturas de fusión medidas y las predichas de los aptámeros de velocidad de disociación lenta. De media, la temperatura de fusión (T_f) calculada es 6 °C inferior a la T_f medida. Las temperaturas de fusión medidas indican que los aptámeros de velocidad de disociación lenta que incluyen estos nucleótidos modificados son más estables que las que se pueden predecir y potencialmente poseen nuevas estructuras secundarias. Estos aptámeros modificados también tienen diferentes espectros de dicroísmo circular que los correspondientes aptámeros que solo incluyen nucleótidos no modificados. En el caso de muchas dianas, es más probable identificar los aptámeros de velocidad de disociación lenta de la diana cuando se usan nucleótidos modificados en la producción de la biblioteca inicial o mezcla candidata.

Modificaciones concretas en la pirimidina en la posición 5 incluyen las descritas en las patentes de EE.UU. 5.719.273 y 5.945.527, así como las que se ilustran en la Fig. 14.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico modificado" hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos que contiene uno o más nucleótidos modificados. En algunas realizaciones puede ser deseable que los nucleótidos modificados sean compatibles con el proceso SELEX.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También incluidos dentro de la definición están, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo,

aminoácidos no naturales etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ser de cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Como se usa en el presente documento, “nucleótido fotorreactivo” significa cualquier nucleótido modificado que es capaz de fotorreticularse con una diana, tal como una proteína, tras la irradiación con determinadas longitudes de onda de luz. Por ejemplo, los fotoaptámeros producidos mediante el proceso photoSELEX pueden incluir un grupo fotorreactivo seleccionado de los siguientes: 5-bromouracilo (BrU), 5-yodouracilo (IU), 5-bromoviniluracilo, 5-yodoviniluracilo, 5-azidouracilo, 4-tiouracilo, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, 5-bromovinilcitosina, 5-yodovinilcitosina, 5-azidocitosina, 8-azidoadenina, 8-bromoadenina, 8-yodoadenina, 8-azidoguanina, 8-bromoguanina, 8-yodoguanina, 8-azidohipoxantina, 8-bromohipoxantina, 8-yodohipoxantina, 8-azidoxantina, 8-bromoxantina, 8-yodoxantina, 5-bromodesoxiuridina, 8-bromo-2'-desoxiadenina, 5-yodo-2'-desoxiuracilo, 5-yodo-2'-desoxicitosina, 5-[(4-azidofenacil)tio]citosina, 5-[(4-azidofenacil)tio]uracilo, 7-deaza-7-yodoadenina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-bromoadenina y 7-deaza-7-bromoguanina. Una “pirimidina fotorreactiva” significa cualquier pirimidina modificada que es capaz de fotorreticularse con una diana tras irradiación de determinadas longitudes de onda. Pirimidinas fotorreactivas de ejemplo incluyen 5-bromo-uracilo (BrdU), 5-bromo-citosina (BrdC), 5-yodo-uracilo (IdU), y 5-yodo-citosina (IdC). En varias realizaciones, el grupo funcional fotorreactivo absorberá en longitudes de onda de luz que no son absorbidas por la diana o las porciones no modificadas del oligonucleótido.

“SELEX” se refiere a un proceso que combina la selección de ácidos nucleicos que interaccionan con una diana de un modo deseable (por ejemplo, unión a una proteína) con la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. El ciclado repetido opcional de las etapas de selección/amplificación permite la selección de uno o un número pequeño de ácidos nucleicos que interaccionan más fuertemente con la diana de un conjunto que contiene un número muy grande de ácidos nucleicos. El ciclado del procedimiento de selección/amplificación continúa hasta conseguir un objetivo determinado. La metodología SELEX se describe en las patentes SELEX. En algunas realizaciones del proceso SELEX se generan aptámeros que se unen de forma no covalente a sus dianas. En otras realizaciones del proceso SELEX se generan aptámeros que se unen de forma covalente a sus dianas.

Como se usa en el presente documento, el término “amplificación” o “amplificar” significa un proceso o combinación de etapas del proceso que aumenta la cantidad o el número de copias de una molécula o clase de moléculas.

“Diana SELEX” o “molécula diana” o “diana” hace referencia en el presente documento a cualquier compuesto sobre el cual un ácido nucleico puede actuar de un modo deseable. Una molécula diana SELEX puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido, polisacárido, glicoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo del estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, pigmento, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier porción o fragmento de cualquiera de los anteriores etc., sin limitaciones. En una realización, una diana SELEX no incluye moléculas que se sabe que se unen a ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, proteínas conocidas que se unen a ácidos nucleicos (p. ej., factores de transcripción). Casi cualquier efector químico o biológico puede ser una diana SELEX adecuada. Moléculas de cualquier tamaño pueden servir como dianas SELEX. Una diana también se puede modificar de ciertos modos para potenciar la probabilidad o la fuerza de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana también puede incluir cualquier variación minoritaria de un compuesto o molécula concreto, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo variaciones minoritarias en la secuencia de aminoácidos, formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador, que o altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una “molécula diana” o “diana” es un conjunto de copias de uno tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. “Moléculas diana” o “dianas” hacen referencia a más de uno de estos conjuntos de moléculas. Realizaciones del proceso SELEX en el que la diana es un péptido se describen en la patente de EE.UU. N° 6.376.190, titulada “Procesos SELEX modificados sin proteína purificada”. La Figura 7 enumera más de 500 dianas para las que se han producido aptámeros que incluyen diversos aptámeros de velocidad de disociación lenta.

Como se usa en el presente documento, “molécula competidora” y “competidor” se usan de forma intercambiable para hacer referencia a cualquier molécula que puede formar un complejo inespecífico con una molécula no diana. En este contexto, las moléculas no diana incluyen aptámeros libres, en los que, por ejemplo, se puede usar un competidor para inhibir la unión del aptámero (reunión), no específica, a otra molécula no diana. Una “molécula competidora” o “competidor” es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula. “Moléculas competidoras” o “competidores” hacen referencia a más de uno de estos conjuntos de moléculas. Las moléculas competidoras incluyen, entre otras, oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón, ARNt, sulfato de dextrano, polidextrano, polímeros de fosfodiéster abásicos, dNTP y pirofosfato). En varias realizaciones se puede usar una combinación de uno o más competidores.

Como se usa en el presente documento, “complejo no específico” hace referencia a una asociación no covalente entre dos o más moléculas distintas a un aptámero y su molécula diana. Un complejo no específico representa una interacción entre clases de moléculas. Complejos no específicos incluyen complejos formados entre un aptámero y una molécula no diana, un competidor y una molécula no diana, un competidor y una molécula diana, y una molécula diana y una molécula no diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión “proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta” hace referencia a un proceso de alteración de las concentraciones relativas de determinados componentes de una mezcla candidata tales como la concentración relativa de complejos de afinidad del aptámero que tienen velocidades de disociación lentas aumenta respecto a la concentración de los complejos de afinidad del aptámero que tienen velocidades de disociación más rápidas, menos deseables. En una realización, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta es un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta basado en solución. En esta realización, un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta basado en solución tiene lugar en solución, de forma que no la diana ni los ácidos nucleicos que forman los complejos de afinidad del aptámero en la mezcla se inmovilizan sobre un soporte sólido durante el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta. En varias realizaciones, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta puede incluir una o más etapas, incluyendo la adición de una incubación con una molécula competidora, dilución de la mezcla o una combinación de estas (por ejemplo, dilución de la mezcla en presencia de una molécula competidora). Dado que el efecto de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta depende generalmente de las velocidades de disociación diferentes de diferentes complejos de afinidad del aptámero (es decir, los complejos de afinidad del aptámero formados entre la molécula diana y diferentes ácidos nucleicos en la mezcla candidata), la duración del proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se selecciona para retener una proporción elevada de los complejos de afinidad del aptámero que tienen velocidades de disociación lenta al tiempo que reducen sustancialmente el número de complejos de afinidad del aptámero que tienen velocidades de disociación rápidas. El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se puede usar en uno o más ciclos durante el proceso SELEX. Cuando la dilución y la adición de un competidor se usan en combinación, se pueden realizar de forma simultánea o secuencial, en cualquier orden. El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se puede usar cuando la concentración de la diana (proteína) total en la mezcla es baja. En una realización, cuando el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta incluye dilución, la mezcla se puede diluir tanto como sea práctico, teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos retenidos por el aptámero se recuperan para las posteriores rondas en el proceso SELEX. En una realización, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta incluye el uso de un competidor, así como la dilución, lo que permite diluir la mezcla menos de lo que podría ser necesario sin el uso de un competidor.

En una disposición, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta incluye la adición de un competidor y el competidor es un polianión (por ejemplo, heparina o sulfato de dextrano (dextrano)). La heparina o el dextrano se han usado en la identificación de aptámeros específicos en selecciones SELEX previas. No obstante, en dichos métodos, la heparina o el dextrano están presentes *durante* la etapa de equilibrado en la que la diana y el aptámero se unen para formar complejos. En dichos métodos, a medida que la concentración de la heparina o el dextrano aumenta, aumenta la proporción entre los complejos diana/aptámero de alta afinidad y los complejos diana/aptámero de baja afinidad. No obstante, una concentración elevada de heparina o dextrano puede reducir el número de complejos diana/aptámero de alta afinidad en el equilibrio debido a la competición por la unión de la diana entre el ácido nucleico y el competidor. Por el contrario, los métodos descritos en el presente documento añaden el competidor *después* de que se ha permitido la formación de complejos diana/aptámero y, por tanto, no afecta al número de complejos formados. La adición del competidor después de que se ha producido la unión en equilibrio entre la diana y el aptámero crea un estado de no equilibrio que evoluciona en el tiempo hasta un nuevo equilibrio con menos complejos de diana/aptámero. El atrapamiento de complejos de diana/aptámero antes de alcanzar el nuevo equilibrio enriquece la muestra para aptámeros de velocidad de disociación lenta, ya que los complejos de velocidad de disociación rápida se disocian primero.

En otra disposición, el competidor polianiónico (p. ej., sulfato de dextrano u otro material polianiónico) se usa en el proceso de enriquecimiento de velocidad lenta para facilitar la identificación de un aptámero que es resistente a la presencia del polianión. En este contexto, “aptámero resistente polianiónico” es un aptámero que es capaz de formar un complejo aptámero/diana que es menos probable que se disocie en la solución que también contiene el material resistente polianiónico que un complejo aptámero/diana que incluye un aptámero resistente no polianiónico. De este modo, los aptámeros existentes polianiónicos se pueden usar en el funcionamiento de métodos analíticos para detectar la presencia o la cantidad o concentración de una diana en una muestra, donde el método de detección incluye el uso del material polianiónico (por ejemplo, sulfato de dextrano) al que el aptámero es resistente.

Por tanto, en una disposición se proporciona un método para producir un aptámero resistente polianiónico. En esta disposición, después de poner en contacto una mezcla candidata de ácidos nucleicos con la diana. Se deja que la diana y los ácidos nucleicos en la mezcla candidata lleguen al equilibrio. Se introduce un competidor polianiónico y se deja incubar en la solución durante un periodo de tiempo suficiente para garantizar que la mayoría de los aptámeros de velocidad de disociación rápida en la mezcla candidata se disocian de la molécula diana. Asimismo, los aptámeros en la mezcla candidata que se pueden disociar en presencia del competidor polianiónico se liberarán de la molécula diana. La mezcla se reparte para aislar los aptámeros de velocidad de disociación lenta de alta afinidad que han permanecido en asociación con la molécula diana y para eliminar todo material que no está en complejo de la solución. Después, el aptámero se puede liberar de la molécula diana y se puede aislar. El aptámero aislado también se puede amplificar y aplicar rondas adicionales de selección para aumentar el funcionamiento global de los aptámeros seleccionados. Este proceso también se puede usar con un tiempo de incubación mínimo si la selección de aptámeros de velocidad de disociación lenta no es necesaria para una aplicación específica.

Por tanto, se proporciona un proceso SELEX modificado para la identificación o producción de aptámeros que tengan velocidades de disociación lentas (prolongadas) en las que la molécula diana y la mezcla candidata entran en contacto y se incuban juntas durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la unión en equilibrio entre la molécula diana y los ácidos nucleicos contenidos en la mezcla candidata. Tras la unión en equilibrio se añade a la mezcla un exceso de molécula competidora, por ejemplo un polianión competidor, y la mezcla se incuba junto con el exceso de molécula competidora durante un periodo de tiempo predeterminado. Una proporción significativa de aptámeros que tienen velocidades de disociación que son inferiores a este periodo de incubación predeterminado se disociarán de la diana durante el periodo de incubación predeterminado. La reasociación de estos aptámeros de velocidad de disociación "rápida" con la diana se minimiza por el exceso de la molécula competidora que puede unirse de forma no específica a la diana y ocupar los sitios de unión diana. Una proporción significativa de aptámeros que tienen velocidades de disociación más largas permanecerán en complejo con la diana durante el periodo de incubación predeterminado. Al final del periodo de incubación, el reparto de los complejos de ácido nucleico-diana del resto de la mezcla permite la separación de una población de aptámeros de velocidad de disociación lenta de los que tienen velocidades de disociación rápidas. Se puede usar una etapa de disociación para disociar los aptámeros de velocidad de disociación lenta de su diana y permite el aislamiento, identificación, secuenciación, síntesis y amplificación de aptámeros de velocidad de disociación lenta (bien de aptámeros individuales o de un grupo de aptámeros de velocidad de disociación lenta) que tienen una afinidad y especificidad altas por la molécula diana. Como con el SELEX convencional, las secuencias de los aptámeros identificadas a partir de una ronda del proceso SELEX modificado se pueden usar en la síntesis de una nueva mezcla candidata de forma que las etapas de contacto, unión en equilibrio, adición de la molécula competidora, incubación con la molécula competidora y reparto de aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden iterar/repeter cuantas veces se desee.

La combinación de permitir la unión en equilibrio de la mezcla candidata con la diana antes de la adición del competidor, seguido de la adición de un exceso de competidor e incubación con el competidor durante un periodo predeterminado de tiempo permite la selección de una población de aptámeros que tienen velocidades de disociación que son mucho mayores que las alcanzadas previamente.

Con el fin de alcanzar la unión en equilibrio, la mezcla candidata se puede incubar con la diana durante al menos aproximadamente 5 minutos o al menos aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas o aproximadamente 6 horas.

El periodo de incubación predeterminado de la molécula competidora con la mezcla de la mezcla candidata y la molécula diana se puede seleccionar según se desee, teniendo en cuenta los factores tales como la naturaleza de la diana y las velocidades de disociación conocidas (si existen) de aptámeros conocidos por la diana. Los periodos de incubación predeterminados se pueden elegir de: al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente minutos, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 6 horas.

En otras disposiciones se usa una dilución como un proceso de potenciación de la velocidad de disociación e incubación de la mezcla candidata diluida, el complejo molécula diana/aptámero se puede someter a un periodo de tiempo predeterminado, que se puede seleccionar de: al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente minutos, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 6 horas.

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a la identificación, producción, síntesis y uso de aptámeros de velocidad de disociación lenta. Estos son aptámeros que tienen una velocidad de disociación ($t_{1/2}$) de un complejo no covalente aptámero-diana que es superior a la de los aptámeros obtenidos normalmente mediante SELEX convencional. Para una mezcla que contiene complejos no covalentes de aptámero y diana, la $t_{1/2}$ representa el tiempo requerido por la mitad de los aptámeros para disociarse de los complejos aptámero-diana. El $t_{1/2}$ de los aptámeros de velocidad de disociación lenta de acuerdo con la presente divulgación se elige de uno de: más de o igual a aproximadamente 30 minutos; entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 240 minutos; entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos; entre aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 90 minutos; entre aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 120 minutos; entre aproximadamente 120 minutos a aproximadamente 150 minutos; entre aproximadamente 150 minutos a aproximadamente 180 minutos; entre aproximadamente 180 minutos a aproximadamente 210 minutos; entre aproximadamente 210 minutos a aproximadamente 240 minutos.

Un rasgo que caracteriza un aptámero identificado por un procedimiento SELEX es su elevada afinidad por su diana. Un aptámero tendrá una constante de disociación (K_d) por su diana que se elige de uno de: menos de aproximadamente $1\mu\text{M}$, menos de aproximadamente 100nM , menos de aproximadamente 10nM , menos de

aproximadamente 1nM, menos de aproximadamente 100pM, menos de aproximadamente 10 pM, menos de aproximadamente 1pM.

“Diana tisular” o “tejido” hace referencia en el presente documento a un subconjunto determinado de las dianas SELEX descritas anteriormente. De acuerdo con esta definición, los tejidos son macromoléculas en un ambiente heterogéneo. Como se usa en el presente documento, tejido hace referencia a un único tipo celular, un conjunto de tipos celulares, un agregado de células o un agregado de macromoléculas. Esto difiere de las dianas SELEX más simples que normalmente son moléculas solubles aisladas, tales como proteínas. En algunas realizaciones, los tejidos son macromoléculas insolubles que son órdenes de magnitud más grandes que las dianas SELEX más simples. Los tejidos con dianas complejas hechas de numerosas macromoléculas, teniendo cada macromolécula numerosos epítomos potenciales. Las diferentes macromoléculas que comprenden los numerosos epítomos pueden ser proteínas, lípidos, hidratos de carbono etc., o combinaciones de las mismas. Los tejidos son generalmente una matriz física de macromoléculas que pueden ser fluidas o rígidas, tanto en términos de estructura como de composición. La matriz extracelular es un ejemplo de un tejido más rígido, tanto estructuralmente como de composición, mientras que una bicapa de membrana tiene una estructura y composición más fluidas. Los tejidos generalmente no son solubles y permanecen en fase sólida y, por tanto, la división se puede realizar con relativa facilidad. Tejido incluye, entre otros, un agregado de células normalmente de un tipo concreto junto con la sustancia intercelular que forma uno de los materiales estructurales de uso habitual para indicar el tejido celular general de un órgano dado, por ejemplo tejido renal, tejido cerebral. Las cuatro clases generales de tejidos son tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido nervioso y tejido muscular.

Ejemplos de tejidos que entran dentro de esta definición incluyen, entre otros, agregados heterogéneos de macromoléculas tales como coágulos de fibrina que son una célula; agregados celulares homogéneos o heterogéneos; estructuras de mayor orden que contienen células que tienen una función específica, tales como órganos, tumores, ganglios linfáticos, arterias etc.; y células individuales. Los tejidos o células pueden estar en su ambiente natural, aislados o en cultivo tisular. El tejido puede estar intacto o modificado. La modificación puede incluir numerosos cambios, tales como transformación, transfección, activación y aislamiento de la subestructura, por ejemplo membranas celulares, núcleos celulares, orgánulos celulares etc.

Fuentes del tejido, estructuras celulares o subcelulares se pueden obtener de procariotas así como de eucariotas. Esto incluye estructuras humanas, animales, vegetales, bacterianas, fúngicas y virales.

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente marcador”, “marcador” o “resto detectable” o “elemento detectable” o “componente detectable” hace referencia a uno o más reactivos que se pueden usar para detectar una molécula diana que está unida a un aptámero. Un resto detectable o marcador es capaz de detectarse directa o indirectamente. En general, cualquier molécula indicadora que sea detectable puede ser un marcador. Los marcadores incluyen, por ejemplo, (i) moléculas indicadoras que se pueden detectar directamente en virtud de generar una señal, (ii) miembros de pares de unión específica que se pueden detectar indirectamente mediante la posterior unión a un afín que contiene una molécula receptora, (iii) marcadores de masa detectables mediante espectrometría de masas, (iv) cebadores oligonucleotídicos que pueden proporcionar un molde para amplificación o unión y (v) una secuencia de polinucleótidos específica o secuencia de reconocimiento que pueden actuar como ligando, tal como, por ejemplo, una proteína represora, en la que en los últimos dos casos, el cebador oligonucleotídico o proteína represora tendrán, o serán capaces de tener, una molécula indicadora y así sucesivamente. La molécula indicadora puede ser un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido que codifica un catalizador, promotor, pigmento, molécula fluorescente, punto cuántico, molécula quimioluminiscente, coenzima, sustrato enzimático, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, secuencia polinucleotídica amplificable, una partícula tal como una partícula de carbono o de látex, cristales sol metálicos, liposoma, célula etc., que pueden o no estar marcados adicionalmente con un pigmento, catalizador u otro grupo detectable, un marcador de masas que altera el peso de la molécula a la cual está conjugado con fines de espectrometría de masas y similares. El marcador se puede seleccionar de materiales electromagnéticos o electroquímicos. En una realización, el marcador detectable es un pigmento fluorescente. Otros marcadores y esquemas de marcaje serán evidentes para un experto en la técnica en base a la divulgación del presente documento.

Un resto detectable (elemento o componente) puede incluir cualquiera de las moléculas indicadoras enumeradas anteriormente y cualquier otra sustancia química o componente que se pueden usar de cualquier manera para generar una señal detectable. El resto detectable se puede detectar mediante una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente o cualquier otra señal detectable que depende de la identidad del resto. En el caso en el que el resto detectable sea una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina), la señal puede generarse en presencia del sustrato enzimático y cualquier factor adicional necesario para la actividad enzimática. En el caso en el que el resto detectable sea un sustrato enzimático, la señal puede generarse en presencia de la enzima y cualquier factor adicional necesario para la actividad enzimática. Configuraciones de reactivos adecuadas para unir el resto detectable a una molécula diana incluyen unión covalente del resto detectable a la molécula diana, asociación no covalente del resto detectable con otro componente del agente de marcaje que está unido covalentemente a la molécula diana y unión covalente del resto detectable a un componente del agente de marcaje que está asociado no covalentemente con la molécula diana. Tinciones proteicas universales (UPS) se describen con detalle en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 10/504,696, presentada el 12 de agosto de 2004, titulada “Métodos y reactivos

para detectar la unión a la diana por ligandos de ácidos nucleicos”.

En el presente documento, “soporte sólido” hace referencia a cualquier sustrato que tiene una superficie a la que las moléculas se pueden unir, directa o indirectamente, a través de enlaces covalentes o no covalentes. Los materiales sustrato pueden ser naturales, sintéticos o una modificación de un material de origen natural. Materiales de soporte sólido pueden incluir silicio, grafito, superficies especulares, laminados, cerámicas, plásticos (incluidos polímeros tales como, por ejemplo (cloruro de poli(vinilo), copolímeros de cicloolefina, poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon®), nylon, poli(butirato de vinilo), germanio, arsenuro de galio, oro, plata etc., usados por sí solos o junto con otros materiales. Se pueden considerar materiales rígidos adicionales, tales como vidrio, que incluye sílice y además incluye, por ejemplo, vidrio que está disponible como Bioglass. Otros materiales que se pueden usar incluyen materiales porosos, tales como, por ejemplo, esferas de vidrio de poro controlado. También se contempla cualquier otro material conocido en la técnica que es capaz de tener uno o más grupos funcionales, tales como cualquiera de un grupo amino, carboxilo, tiol o hidroxilo, por ejemplo, incorporado en su superficie.

El soporte sólido puede tomar cualquiera de diversas configuraciones que varían desde simples a complejas y pueden tener una cualquiera de una serie de formas, incluyendo una tira, placa, disco, rodillo, partícula, incluyendo esferas, tubos, pocillos y similares. La superficie puede ser relativamente plana (p. ej., un portaobjetos), esférica (p. ej., una esfera), cilíndrica (p. ej., una columna) o ranurada. Soportes sólidos de ejemplo que se pueden usar incluyen pocillos de microtitulación, membranas, esferas paramagnéticas, papel cargado, películas de Langmuir-Blodgett, virutas de obleas de silicio, virutas de flujo continuo y microesferas.

Como se usa en el presente documento, “división” significa cualquier proceso por el cual uno o más componentes de una mezcla se separan de otros componentes de la mezcla. Por ejemplo, los aptámeros unidos a moléculas diana se pueden separar de otros ácidos nucleicos que no están unidos a moléculas diana y de moléculas no diana. Más ampliamente, la división permite la separación de todos los ácidos nucleicos en una mezcla candidata en al menos dos conjuntos en base a su afinidad relativa y/o velocidad de disociación por la molécula diana. La repartición se puede conseguir mediante varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo filtración, cromatografía de afinidad, repartición líquido-líquido, HPLC etc. Por ejemplo, los pares de ácido nucleico-proteína se pueden unir a filtros de nitrocelulosa mientras que los ácidos nucleicos no unidos no. Las columnas que retienen específicamente los complejos de ácido nucleico-diana también se pueden usar para la repartición. Por ejemplo, los oligonucleótidos capaces de asociarse con una molécula diana unida en una columna permiten el uso de cromatografía en columna para separar y aislar los aptámeros de afinidad más alta. Esferas sobre las que se conjugan moléculas diana también se pueden usar para la repartición de aptámeros en una mezcla. Si las esferas son paramagnéticas, la repartición se puede conseguir mediante la aplicación de un campo magnético. Se puede usar tecnología de resonancia en plasmón superficial para la repartición de ácidos nucleicos mediante inmovilización en una diana sobre un chip sensor y flujo de la mezcla sobre el chip, en la que dichos ácidos nucleicos que tienen afinidad por la diana pueden unirse a la diana y los ácidos nucleicos restantes se pueden eliminar mediante lavado. Se puede usar repartición líquido-líquido, así como retraso de filtración en gel y centrifugación en gradiente de densidad. También se pueden usar marcadores de afinidad en las moléculas diana para separar las moléculas de ácido nucleico unidas a la diana marcada de aptámeros que están libres en solución. Por ejemplo, las moléculas diana biotiniladas, junto con los aptámeros unidos a ellas, se pueden secuestrar en la solución de secuencias de ácidos nucleicos no unidos usando esferas paramagnéticas de estreptavidina. Los marcadores de afinidad también se pueden incorporar en el aptámero durante la preparación.

Como se usa en el presente documento, “photoSELEX” es un acrónimo de Photochemical Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (Evolución Sistemática Fotoquímica de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial) y hace referencia a realizaciones del proceso SELEX en el que se generan aptámeros de fotorreticulación. En una realización del proceso photoSELEX, un nucleótido fotorreactivo activado mediante absorción de luz se incorpora en lugar de una base nativa en bibliotecas de oligonucleótidos aleatorizadas de ARN o ssADN, la mezcla de la molécula diana – ácido nucleico se irradia, lo que hace que algunos ácidos nucleicos incorporados en los complejos ácido nucleico-molécula diana se reticulen con la molécula diana a través de los grupos funcionales fotorreactivos y la etapa de selección es una selección de la actividad de fotorreticulación. El proceso de photoSELEX se describe con gran detalle en las patentes de PhotoSELEX.

Como se usa en el presente documento, “fotoaptámero”, “aptámero fotorreactivo” y “aptámero fotorreactivo” se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que se pueden unir de forma covalente o “reticular” con una molécula diana. Por ejemplo, un residuo de ácido nucleico de origen natural se puede modificar para que incluya un grupo funcional químico que confiera fotorreactividad al residuo de ácido nucleico tras la exposición a una fuente de radiación de una longitud de onda adecuada. En algunas realizaciones, inicialmente se identifica un aptámero fotorreactivo. En otras realizaciones, un aptámero se identifica primero y después se modifica para que incorpore uno o más grupos funcionales fotorreactivos, generando de este modo un fotoaptámero. En estas realizaciones, uno o más residuos de ácido nucleico fotorreactivos se pueden incorporar en un aptámero sustituyendo un residuo de ácido nucleico fotorreactivo en lugar de uno o más de otros nucleótidos, tales como uno o más nucleótidos de timidina y/o citidina en el aptámero, por ejemplo, modificando uno o más residuos de ácido nucleico para incluir un grupo funcional

fotorreactivo.

Grupos funcionales fotorreactivos de ejemplo que se pueden incorporar mediante un fotoaptámero incluyen 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 5-bromoviniluracilo, 5-yodoviniluracilo, 5-azidouracilo, 4-tiouracilo, 5-tiouracilo, 4-tiocitosina, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, 5-bromovinilcitosina, 5-yodovinilcitosina, 5-azidocitosina, 8-azidoadenina, 8-bromoadenina, 8-yodoadenina, 8-azidodoguanina, 8-bromoguanina, 8-yodoguanina, 8-azidohipoxantina, 8-bromohipoxantina, 8-yodohipoxantina, 8-azidoxantina, 8-bromoxantina, 8-yodoxantina, 5-[(4-azidofenacil)tio]citosina, 5-[(4-azidofenacil)tio]uracilo, 7-deaza-7-yodoadenina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-bromoadenina y 7-deaza-7-bromoguanina.

Además de estos grupos funcionales fotorreactivos basados en nucleósidos de ejemplo, también se pueden usar otros grupos funcionales fotorreactivos que se pueden añadir a un extremo terminal de un aptámero usando una molécula enlazadora adecuada. Dichos grupos funcionales fotorreactivos incluyen benzofenona, antraquinona, 4-azido-2-nitroanilina, psoraleno, derivados de cualquiera de estos, y similares.

Un grupo funcional fotorreactivo incorporado mediante un fotoaptámero puede activarse mediante cualquier método adecuado. En una realización, un fotoaptámero que contiene un grupo funcional fotorreactivo se puede reticular con su diana mediante exposición del fotoaptámero y su molécula diana unida a una fuente de radiación electromagnética. Tipos adecuados de radiación electromagnética incluyen luz ultravioleta, luz visible, rayos X y rayos gamma. Fuentes de radiación adecuadas incluyen fuentes que usan luz monocromática o luz policromática filtrada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "el proceso SELEX de afinidad" hace referencia a realizaciones del proceso SELEX en las que se generan aptámeros no fotorreticulantes por dianas. En algunas realizaciones del proceso SELEX de afinidad, la diana se inmoviliza en un soporte sólido antes o después de que la diana entre en contacto con la mezcla candidata de ácidos nucleicos. La asociación de la diana con el soporte sólido permite que los ácidos nucleicos en la mezcla candidata que están unidos y en el caso en el que se use un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta, permanezcan unidos a la diana para su separación del resto de la mezcla candidata. La expresión "proceso SELEX de afinidad en esferas" hace referencia a realizaciones concretas del proceso SELEX de afinidad en las que la diana se inmoviliza sobre una esfera, por ejemplo, antes del contacto con la mezcla candidata de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, las esferas son esferas paramagnéticas. La expresión "proceso SELEX de afinidad con filtro" hace referencia a realizaciones en las que los complejos de ácido nucleico-diana se separan de la mezcla candidata en virtud de su asociación con un filtro, tal como un filtro de nitrocelulosa. Esto incluye realizaciones en las que la diana y ácidos nucleicos se ponen en contacto inicialmente en solución y en contacto con el filtro, y también incluye realizaciones en las que los ácidos nucleicos entran en contacto con la diana que está previamente inmovilizada sobre el filtro. La expresión "proceso SELEX de afinidad en placa" hace referencia a realizaciones en las que la diana está inmovilizada sobre la superficie de una placa, tal como, por ejemplo, una placa de microtitulación en múltiples pocillos. En algunas realizaciones, la placa está compuesta por poliestireno. En algunas realizaciones, la diana está unida a la placa en el proceso SELEX de afinidad en placa a través de interacciones hidrofóbicas.

La presente divulgación describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que son capaces de unirse a moléculas diana. Más específicamente, la presente divulgación describe métodos para identificar aptámeros y/o fotoaptámeros que tienen velocidades de disociación más lentas de sus respectivas moléculas diana que los aptámeros obtenidos con los métodos SELEX anteriores. La divulgación describe además aptámeros y/o fotoaptámeros obtenidos usando los métodos descritos en el presente documento y métodos de usar los mismos.

Se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo el método (a) preparar una mezcla candidata de secuencias de ácido nucleico; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una molécula diana en la que los ácidos nucleicos con las afinidades relativas más altas por la molécula diana se unen preferentemente a la molécula diana, formando complejos ácido nucleico-molécula diana; (c) aplicar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para permitir la disociación de los complejos ácido nucleico-molécula diana con velocidades de disociación relativamente rápidas; (d) repartir los complejos de ácido nucleico-molécula diana restantes de los ácidos nucleicos libres y las moléculas no diana en la mezcla candidata; y (e) identificar un aptámero de la molécula diana. El proceso puede además incluir la etapa repetida de amplificar los ácidos nucleicos que se unen a la molécula diana para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias que pueden unirse a la molécula diana y producir todavía complejos de ácido nucleico-molécula diana que tienen velocidades de disociación lentas. Como se ha definido anteriormente, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se puede seleccionar de dilución de la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana, adición de al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana y dilución de la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana y adición de al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana.

Se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo el método: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la

mezcla candidata con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen a la molécula diana formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) incubar la mezcla candidata y la molécula diana juntas durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar la unión en el equilibrio; (d) añadir un exceso de al menos una molécula competidora a la mezcla de (c); (e) incubar la mezcla de la mezcla candidata, los complejos de ácido nucleico-molécula diana y la molécula competidora de (d) durante un periodo de tiempo predeterminado; (f) separar los complejos de ácido nucleico-molécula diana de la mezcla candidata; (g) disociar los complejos de ácido nucleico-molécula diana para generar ácidos nucleicos libres; (h) amplificar los ácidos nucleicos libres para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a la molécula diana con mayor afinidad, de modo que se pueda identificar un aptámero de la molécula diana.

Se proporciona un método para producir un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo el método preparar o sintetizar un aptámero que incluya una secuencia de ácido nucleico identificada por el siguiente proceso que comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen a la molécula diana formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) incubar la mezcla candidata y la molécula diana juntas durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar la unión en el equilibrio; (d) añadir un exceso de al menos una molécula competidora a la mezcla de (c); (e) incubar la mezcla de la mezcla candidata, los complejos de ácido nucleico-molécula diana y la molécula competidora de (d) durante un periodo de tiempo predeterminado; (f) separar los complejos de ácido nucleico-molécula diana de la mezcla candidata; (g) disociar los complejos de ácido nucleico-molécula diana para generar ácidos nucleicos libres; (h) amplificar los ácidos nucleicos libres para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a la molécula diana con mayor afinidad, de modo que se identifique un aptámero de la molécula diana.

Se proporciona un método de identificar un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo el método: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en la que la mezcla candidata comprende ácidos nucleicos modificados en los que una, varias o todas las pirimidinas en al menos uno, o cada uno, ácido nucleico de la mezcla candidata está modificada químicamente en la posición 5; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen a la molécula diana formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad del resto de la mezcla candidata; y (d) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad mayor para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a la molécula diana con mayor afinidad, de modo que se pueda identificar un aptámero de la molécula diana.

Se proporciona un método para producir un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo dicho método preparar o sintetizar un aptámero que incluya una secuencia de ácido nucleico identificada por el siguiente proceso: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en la que la mezcla candidata comprende ácidos nucleicos modificados en los que una, varias o todas las pirimidinas en al menos uno, o cada uno, ácido nucleico de la mezcla candidata está modificada químicamente en la posición 5; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen a la molécula diana formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad del resto de la mezcla candidata; y (d) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad mayor para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a la molécula diana con mayor afinidad, de modo que se identifique un aptámero de la molécula diana.

En otra realización se proporciona un complejo no covalente de un aptámero y su diana, en el que la velocidad de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la diana se elige de uno de: más de o igual a aproximadamente 30 minutos; entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 240 minutos; entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos; entre aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 90 minutos, entre aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 120 minutos; entre aproximadamente 120 minutos a aproximadamente 150 minutos; entre aproximadamente 150 minutos a aproximadamente 180 minutos; entre aproximadamente 180 minutos a aproximadamente 210 minutos; entre aproximadamente 210 minutos a aproximadamente 240 minutos.

En otra realización se proporciona un complejo no covalente de un aptámero y su diana, en el que el aptámero tiene una K_d por la diana de aproximadamente 100nM o menos, en el que la velocidad de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la diana es superior o igual a aproximadamente 30 minutos, en el que una, varias o todas las pirimidinas en la secuencia de ácido nucleico del aptámero está modificada en la posición 5 de la base. Las modificaciones se pueden seleccionar del grupo de compuestos mostrado en la FIG. 14, estas modificaciones se denominan "nucleótidos de base modificada". Los aptámeros se pueden diseñar con cualquier combinación de las pirimidinas de base modificada deseada.

En la solicitud de EE.UU. Nº de serie 12/175,388, titulada "Improved SELEX and PHOTOSELEX" que se está presentado a la vez con la presente solicitud se divulgan métodos mejorados para realizar SELEX con nucleótidos modificados, incluyendo nucleótidos que contienen grupos fotoactivos o nucleótidos que contienen soportes para grupos fotoactivos. En otra disposición, la mezcla candidata de moléculas de ácidos nucleicos incluye ácidos nucleicos que contienen bases nucleotídicas modificadas que pueden ayudar a la formación de complejos de ácidos nucleicos modificados-diana que tienen velocidades de disociación relativamente lentas.

Los diversos métodos y etapas descritos en el presente documento se pueden usar para generar un aptámero capaz de (1) unirse a una molécula diana o (2) unirse a una molécula diana y formar después un enlace covalente con la molécula diana tras irradiación.

Los aptámeros identificados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento son útiles en una serie de métodos diagnósticos y terapéuticos. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta se unirán a la diana para una duración mayor. Esto es útil en los métodos diagnósticos en los que la unión de un aptámero a la diana se puede usar para detectar la presencia, ausencia, cantidad de la molécula diana y una interacción prolongada del aptámero y la diana facilita dicha detección. Una ventaja similar se puede proporcionar cuando los aptámeros de velocidad de disociación lenta se usan en métodos de imagen, *in vitro* o *in vivo*. Una interacción prolongada del aptámero y la diana también proporcionan mejores métodos terapéuticos de tratamiento en los que la interacción prolongada puede permitir un efecto terapéutico mejorado, por ejemplo debido a la activación o inhibición más prolongada de la molécula diana o la cascada de señalización aguas abajo.

En consecuencia, en varias realizaciones, los aptámeros de velocidad de disociación lenta obtenidos, identificados o producidos por los métodos descritos se pueden usar en varios métodos de tratamiento médico o método de diagnóstico (*in vitro* o *in vivo*).

En otra realización, los aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden usar *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades. En otra realización, un aptámero de velocidad de disociación lenta se puede usar en la fabricación de una terapéutica (p. ej., composición farmacéutica) o la fabricación de un agente diagnóstico para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de enfermedades. Aplicaciones diagnósticas o terapéuticas de aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden implicar un resultado diagnóstico o terapéutico que depende de la unión específica y/o de alta afinidad del aptámero de velocidad de disociación lenta por su diana. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta también se pueden usar en la validación de la diana y ensayos de detección de alto rendimiento en el proceso de desarrollo de fármacos.

Los aptámeros de velocidad de disociación lenta son reactivos adecuados para la obtención de imágenes moleculares *in vivo*. Se puede usar un aptámero de velocidad de disociación lenta *in vivo* para detectar la presencia de una enfermedad, proceso patológico u otra afección en el cuerpo de un individuo (p. ej., un ser humano o un animal), en el que la unión del aptámero a su diana indica la presencia del proceso patológico u otra afección. Por ejemplo, un aptámero del receptor de VEGF se puede usar *in vivo* para detectar la presencia de cáncer en una zona determinada (p. ej., un tejido, un órgano etc.) del cuerpo de un individuo, ya que el receptor de VEGF se expresa abundantemente dentro de los tumores y su neovascularización, o se puede usar un aptámero del receptor de EGF *in vivo* para detectar la presencia de cáncer en una zona determinada (p. ej., un tejido, un órgano etc.) del cuerpo de un individuo, ya que el receptor de VEGF se expresa a menudo a niveles altos en las células tumorales. Es decir, la diana molecular será el dominio extracelular (DEC) de un receptor inducido, ya que dichas dianas se localizan fuera de las células y son accesibles a través de la vasculatura. Adicionalmente, los DEC tienden a localizarse en el lugar de la enfermedad, aunque alguna pequeña fracción del DEC específico pueda desprenderse mediante procesos biológicos, incluyendo la muerte celular.

Los candidatos obvios para la obtención de imágenes moleculares, los anticuerpos monoclonales de alta afinidad, no se han convertido en el reactivo de elección para esta aplicación. Los reactivos de obtención de imágenes moleculares tienen requisitos precisos. Deben tener una actividad de unión alta para su diana prevista y actividad de unión baja para otras dianas en un ser humano o animal. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta tienen ventajas únicas que los convierten en deseables para usar en la obtención de imágenes moleculares *in vivo*. Por otro lado, se seleccionan de modo que tengan constantes de disociación lentas, lo que permite una residencia *in vivo* en la diana prevista para una duración de tiempo sustancial (al menos aproximadamente 30 minutos). Por otro lado, cabe esperar que los aptámeros de velocidad de disociación lenta tengan un aclaramiento muy rápido de la vasculatura. Las constantes de disociación lentas y el aclaramiento rápido de la vasculatura son dos propiedades deseadas para la obtención de imágenes moleculares *in vivo*. Desde una perspectiva cinética, los buenos reactivos de obtención de imágenes moleculares *in vivo* deben permanecer localizados en el lugar de la enfermedad, mientras que la concentración de reactivo libre en la vasculatura adyacente se hace baja. Esta es una limitación de la señal-ruido. Se pueden obtener proporciones señal-ruido adecuadas mediante la acumulación de la señal en el lugar de la enfermedad en exceso de la señal en la vasculatura o se pueden obtener mediante retención de una señal en el lugar de la enfermedad mientras que la concentración en la vasculatura disminuye.

Los aptámeros que no tienen propiedades de velocidad de disociación lentas, de aproximadamente el mismo peso molecular y la carga neta como aptámeros de velocidad de disociación lentas, se han estudiado en animales y seres

humanos durante más de una década. En general, se ha descubierto que estos aptámeros se eliminan de la vasculatura rápidamente, normalmente al entrar en el riñón y/o el hígado y después porque son metabolizados adicionalmente para excreción. Dichos aptámeros muestran el denominado aclaramiento de "primer paso" a menos que aductos de peso molecular alto (tal como, por ejemplo, PEG) estén unidos a los aptámeros. Se han realizado experimentos dentro de un aptámero cuya diana es la tenascina C, una proteína extracelular (no un DEC) hallada a concentraciones altas en algunos tumores. En dichos experimentos, el aptámero específico de la tenascina C se aclaró rápidamente y pudo retenerse en el sitio del tumor porque la concentración local extracelular de la tenascina C es muy alta. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta, por el contrario, mantendrán la tasa de aclaramiento rápida de los aptámeros pero ofrecen una ventaja cinética debido a sus lentas velocidades de disociación, lo que les hace adecuados para usar con dianas cuya presencia en el lugar de interés (por ejemplo, en el lugar de la enfermedad) puede ser algo escasa (DEC en tumores, por ejemplo).

Reactivos alternativos para obtención de imágenes moleculares no comparten las dos propiedades de los aptámeros de velocidad de disociación lenta (es decir, tasa de disociación lenta y aclaramiento rápido del cuerpo). Los anticuerpos monoclonales a menudo tienen afinidad y especificidad altas y pueden tener constantes de disociación lentas; no obstante, los anticuerpos monoclonales tienen velocidades de aclaramiento de la vasculatura muy lentas. Los péptidos cortos, identificados a través de, por ejemplo, expresión en fagos, pueden tener un aclaramiento rápido pero mala afinidad y especificidad y rápidas tasas de disociación de sus dianas previstas. Los anticuerpos, una versión peptídica concreta de un mimético de anticuerpo, pueden tener una afinidad y especificidad razonables y pueden tener un aclaramiento más rápido que los anticuerpos monoclonales, aunque para conseguir velocidades de disociación de sus dianas lentas, los anticuerpos a menudo se forman como dímeros y multímeros de orden mayor, lo que ralentiza su aclaramiento al mismo tiempo que potencia sus velocidades de disociación.

Los aptámeros de velocidad de disociación lenta se pueden usar para la obtención de imágenes moleculares *in vivo* con uno o más aductos de bajo peso molecular para proteger el aptámero de velocidad de disociación lenta de las nucleasas en el cuerpo y detectar la diana prevista una vez que se ha unido el aptámero de velocidad de disociación lenta. Por ejemplo, los aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden ser atacados por las nucleasas de la sangre, normalmente exonucleasas (para ADN) que se bloquean fácilmente usando aductos resistentes a exonucleasa en las posiciones 5' and 3' terminales del aptámero de velocidad de disociación lenta, o endonucleasa (para ANR) que se bloquean fácilmente incorporando pirimidinas resistentes a endonucleasas (tales como, por ejemplo, 2'-fluoro-nucleótidos) en el aptámero de velocidad de disociación lenta. La detección del complejo aptámero de velocidad de disociación lenta-diana se puede conseguir uniendo un resto de detección al aptámero de velocidad de disociación lenta. En algunas realizaciones, el resto de detección para estos fines puede incluir jaulas para moléculas radiactivas (por ejemplo, tecnecio 99), grupos de hierro para detección por resonancia magnética, isótopos de flúor para obtención de imágenes PET y similares. Las modificaciones realizadas en el aptámero de velocidad de disociación lenta para proteger la integridad del aptámero de velocidad de disociación lenta en el cuerpo y permitir la detección de la diana prevista deberán diseñarse de un modo tal que no interfieran con la interacción del aptámero de velocidad de disociación lenta con su diana y que no haga que el aptámero de velocidad de disociación lenta se elimine demasiado despacio de la vasculatura.

También se proporcionan dispositivos diagnósticos o de ensayo, por ejemplo columnas, tiras de ensayo o biochips, que tienen uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta adheridos a una superficie sólida del dispositivo. El o los aptámeros se pueden colocar de modo que puedan unirse a las moléculas diana que están en contacto con la superficie sólida para formar complejos aptámero-diana que permanezcan adheridos a la superficie del dispositivo, capturando de este modo la diana y permitiendo la detección y opcionalmente la cuantificación de la diana. Se puede proporcionar un dispositivo de aptámeros de velocidad de disociación lenta (que pueden ser iguales o diferentes) en dicho dispositivo.

En otra realización se proporcionan complejos que incluyen un aptámero de velocidad de disociación lenta y una molécula diana. Se proporciona una clase de aptámeros caracterizados por tener una afinidad elevada por sus correspondientes moléculas diana y velocidades de disociación ($t_{1/2}$) lentas de un complejo no covalente del aptámero y la diana.

En referencia a la FIG. 1A, el proceso SELEX básico generalmente comienza con la preparación de una mezcla candidata de ácidos nucleicos de diferente secuencia. La mezcla candidata generalmente incluye secuencias de ácido nucleico que incluyen dos regiones fijadas (es decir, cada uno de los miembros de la mezcla candidata contiene las mismas secuencias en la misma localización) y una región variable. Normalmente, las regiones fijadas de la secuencia se seleccionan de un modo tal que ayuden a las etapas de amplificación descritas más adelante o aumentan el potencial de una disposición estructural dada de los ácidos nucleicos en la mezcla candidata. La región variable normalmente proporciona la región de unión diana de cada ácido nucleico en la mezcla candidata y esta región variable se puede aleatorizar completamente (es decir, siendo la probabilidad de hallar una base en cualquier posición de una de cuatro) o aleatorizar únicamente parcialmente (por ejemplo, la probabilidad de hallar una base en cualquier posición se puede seleccionar en cualquier nivel entre 0 y 100 por ciento). La mezcla candidata preparada se pone en contacto con la diana seleccionada en condiciones que son favorables para que se produzca la unión entre la diana y los miembros de la mezcla candidata. En estas condiciones, la interacción entre la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla candidata forma generalmente pares de ácido nucleico-diana que tienen la afinidad relativa

más fuerte entre los miembros del par. Los ácidos nucleicos con la afinidad más alta por la diana se separan de los ácidos nucleicos con menor afinidad por la diana. El proceso de repartición se realiza de un modo que se conserve el número máximo de candidatos de afinidad alta. Los ácidos nucleicos que durante la repartición se seleccionan por una afinidad relativamente alta por la diana se amplifican para crear una nueva mezcla candidata que está enriquecida en los ácidos nucleicos que tienen una afinidad relativamente alta por la diana. Repitiendo las etapas de repartición y amplificación anteriores, la recién formada mezcla candidata contiene cada vez menos secuencias únicas y el grado promedio de afinidad de la mezcla de ácidos nucleicos por la diana generalmente aumentará. Llevando esto al extremo, el proceso SELEX dará una mezcla candidata que contiene uno o un número muy pequeño de ácidos nucleicos únicos que representan los ácidos nucleicos de la mezcla candidata original que tiene la afinidad más alta por la molécula diana. No obstante, este proceso SELEX básico no selecciona aptámeros que tengan velocidades de disociación lentas por sus dianas.

Las patentes SELEX y las patentes PhotoSELEX describen y elaboran este proceso con gran detalle. Estas patentes incluyen descripciones de las varias dianas que se pueden usar en el proceso; métodos para la preparación de la mezcla candidata inicial; métodos para separar ácidos nucleicos dentro de una mezcla candidata y métodos para amplificar los ácidos nucleicos separados para generar mezclas candidatas enriquecidas. Las patentes SELEX también describen soluciones de aptámeros obtenidas para un número de diferentes tipos de moléculas diana, incluyendo dianas proteicas en las que la proteína es y no es una proteína de unión a ácido nucleico.

Con referencia a la FIG. 1B, el proceso SELEX modificado divulgado en el presente documento incluye la introducción de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta tras el equilibrio de la mezcla candidata de ácidos nucleicos con la diana o las dianas y una etapa de repartición antes de las posteriores etapas en el proceso SELEX. La introducción de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta en el proceso SELEX básico proporciona un medio para enriquecer los complejos de afinidad del aptámero con velocidades de disociación lentas de un conjunto de complejos de ácido nucleico-diana que incluye diversas velocidades de disociación. Por tanto, el proceso SELEX modificado proporciona un método para identificar aptámeros que se unen a moléculas diana y, una vez unidos, tienen velocidades de disociación relativamente lentas (también denominadas en el presente documento "tasas de disociación") de la molécula diana.

Como se usa en el presente documento, "unión" generalmente se refiere a la formación de una asociación no covalente entre el ligando y la diana, aunque dicha unión no es necesariamente reversible. Las expresiones "complejo ácido nucleico-diana" o "complejo" o "complejo de afinidad" se usan para hacer referencia al producto de dicha asociación de unión no covalente.

En varias realizaciones, los aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden ser oligonucleótidos de ARN o ADN de una o dos cadenas. Los aptámeros pueden contener bases no estándar o modificadas. Adicionalmente, los aptámeros pueden contener cualquier tipo de modificación. Como se usa en el presente documento, una "base modificada" puede incluir una modificación relativamente simple en un residuo de ácido nucleico natural, modificación que confiere un cambio en las propiedades físicas del residuo de ácido nucleico. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, modificaciones en la posición 5 de las pirimidinas, la sustitución con grupos hidrófobos, por ejemplo bencilo, isobutilo, indol o naftilo, o la sustitución con grupos hidrófilos, por ejemplo amina cuaternaria o guanidinio, o grupos más "neutros", por ejemplo imidazol y similares. Modificaciones adicionales pueden estar presentes en el anillo de ribosa, por ejemplo en la posición 2', tal como as 2'-amino (2'-NH₂) y 2'-fluoro (2'-F), o la estructura de fosfodiéster, por ejemplo fosforotioatos o fosfonatos de metilo.

En varias disposiciones, una mezcla candidata que contiene un conjunto aleatorizado de secuencias de ácido nucleico que contienen bases nucleotídicas modificadas se mezcla con una cantidad de la molécula diana y se deja establecer el equilibrio de unión con la molécula diana. En general, solo algunos de estos ácidos nucleicos que se unen con afinidad alta por la molécula diana se separarán con eficiencia de la diana.

En varias disposiciones, la mezcla candidata incluye secuencias de ácido nucleico que tienen regiones variables que incluyen grupos modificados. Los grupos modificados pueden ser bases nucleotídicas modificadas. La región variable puede contener secuencias completa o parcialmente aleatorias; también puede contener subporciones de una secuencia fija que se incorpora dentro de la región variable. Los nucleótidos dentro de las regiones fijas también pueden contener bases nucleotídicas modificadas o pueden contener el conjunto estándar de bases de origen natural.

En algunas disposiciones, la amplificación se produce después de que los miembros de la mezcla de ensayo se han separado y es el ácido nucleico lo que se amplifica. Por ejemplo, la amplificación de moléculas de ARN se puede llevar a cabo mediante una secuencia de tres reacciones, hacer copias de ADNc de ARN seleccionados usando la reacción en cadena de la polimerasa para aumentar el número de copias de cada ADNc y transcribir las copias de ADNc para obtener moléculas de ARN que tienen las mismas secuencias que los ARN seleccionados. Cualquier reacción o combinación de reacciones conocidas en la técnica se pueden usar como adecuadas, incluyendo replicación directa de ADN, amplificación directa de ARN y similares, como reconocerán los expertos en la técnica. El método de amplificación puede dar lugar a proporciones de la mezcla amplificada representativas de las proporciones de diferentes secuencias en la mezcla antes de la amplificación. Se sabe que muchas modificaciones

en los ácidos nucleicos son compatibles con la amplificación enzimática. Las modificaciones que no son compatibles con la amplificación se pueden realizar tras cada ronda amplificación, en caso necesario.

La mezcla candidata de ácidos nucleicos se puede modificar de varias formas para aumentar la probabilidad de que los ácidos nucleicos tengan propiedades de facilitación u otras propiedades deseables, en particular aquellas que potencian la interacción entre el ácido nucleico y la diana. Las modificaciones contempladas incluyen modificaciones que introducen otros grupos químicos que tienen la carga, la polarizabilidad, la unión de hidrógeno o la interacción electrostática correctas para potenciar las interacciones ligando-diana deseadas. Las modificaciones que pueden mejorar las propiedades de unión, incluyendo las tasas de afinidad y/o de disociación, del ácido nucleico, por ejemplo, incluyen restos hidrófilos, restos hidrófobos, estructuras rígidas, grupos funcionales encontrados en las proteínas, tales como imidazoles, alcoholes primarios, carboxilatos, grupos guanidinio, grupos amino, tioles y similares. Las modificaciones también pueden usarse para aumentar la supervivencia de los complejos aptámero-diana en condiciones de selección rigurosas que se pueden aplicar para producir aptámeros de velocidad de disociación lenta a una amplia gama de dianas. En una realización, Bz-dU (bencil-dU) se utiliza en la generación de las mezclas candidatas usadas para producir aptámeros de velocidad de disociación lenta, aunque otros nucleótidos modificados son muy adecuados para la producción de tales aptámeros. Otros nucleótidos modificados se muestran en la FIG. 14.

Mezclas candidatas de nucleótidos modificados para el propósito de esta solicitud es cualquier mezcla candidata de ARN o ADN que incluya nucleótidos tanto de origen natural como de origen distinto al natural. Modificaciones adecuadas incluyen modificaciones en cada residuo del ácido nucleico, en un único residuo del ácido nucleico, en residuos aleatorios, en todas las pirimidinas o purinas, todos en todas las apariciones de una base específica (es decir, G, C, A, T o U) en el ácido nucleico, o cualquier otro esquema de modificación que puede ser adecuado para una aplicación particular. Se reconoce que la modificación no es un requisito previo para facilitar la actividad o la capacidad de unión de los aptámeros. Los aptámeros pueden incluir residuos dUTP y dCTP modificados.

Las mezclas candidatas para aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden comprender un conjunto de pirimidinas que tienen una modificación diferente en la posición de la base C-5. La modificación en C-5 puede introducirse a través de un enlace amida, directamente, o indirectamente a través de otro tipo de enlace. Estas mezclas candidatas se utilizan en un proceso SELEX para identificar aptámeros de velocidad de disociación lenta. Este proceso también puede incluir el uso del proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta. Las mezclas candidatas se pueden producir enzimáticamente o sintéticamente.

Como se ha descrito anteriormente, los nucleótidos pueden modificarse de muchos modos, incluyendo modificaciones en las posiciones de la ribosa y/o el fosfato y/o la base. Determinadas modificaciones se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.660.985 titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", la patente de EE.UU. Nº 5.428.149 titulada "Method for Palladium Catalyzed Carbon-Carbon Coupling and Products," la patente de EE.UU. Nº 5.580.972 titulada "Purine Nucleoside Modifications by Palladium Catalyzed Methods. En una realización, las modificaciones son aquellas en las que otro grupo químico se une en la posición 5 de una pirimidina, la posición 8 de una purina o la posición 2' de un azúcar. No existen limitaciones en el tipo de otro grupo químico que se puede incorporar en los nucleótidos individuales. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado resultante es amplificable o se puede modificar con posterioridad a las etapas de amplificación (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 300.074 titulada "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Chemi-SELEX".

En otras disposiciones más, ciertos nucleótidos se modifican de tal manera que un método para producir aptámeros que se unan y formen una reticulación covalente con su molécula diana tras la fotoactivación del complejo de afinidad. Este método abarca aptámeros que se unen, fotorreticulan y/o fotoactivan moléculas diana. En diversas disposiciones, los aptámeros contienen grupos fotorreactivos que son capaces de fotorreticularse con la molécula diana tras la irradiación con luz. En otras disposiciones, los aptámeros son capaces de formar enlaces con la diana en ausencia de irradiación.

Un grupo fotorreactivo puede ser cualquier estructura química que contenga un fotocromóforo y que sea capaz de fotorreticularse con una molécula diana. Aunque en el presente documento se denominan grupos fotorreactivos, en algunos casos, como se describe a continuación, la irradiación no es necesaria para que ocurra la unión covalente entre el aptámero y la diana. En algunas realizaciones, el grupo fotorreactivo absorberá la luz de una longitud de onda que no es absorbida por la diana o las porciones no modificadas del oligonucleótido. Los grupos fotorreactivos incluyen 5-halo-uridinas, 5-halo-citosinas, 7-halo-adenosinas, 2-nitro-5-azidobenzosilos, diazirinas, azidas de arilo, azidas de arilo fluoradas, benzofenonas, amino-benzofenonas, psoralenos, antraquinonas, etc.

Los grupos fotorreactivos generalmente forman enlaces con la diana tras la irradiación del par ácido nucleico - diana asociado. En algunos casos, la irradiación no es necesaria para que se produzca la formación del enlace. El fotorreticulación que se produce normalmente será la formación de un enlace covalente entre el aptámero asociado y la diana. Sin embargo, también puede producirse una interacción iónica estrecha entre el aptámero y la diana tras la irradiación.

En una disposición, la fotorreticulación se produce debido a la exposición a radiación electromagnética. Radiación electromagnética incluye luz ultravioleta, luz visible, rayos X y rayos gamma.

En otras varias disposiciones, a una selección limitada de oligonucleótidos utilizando un método SELEX le sigue una selección a través de un método photoSELEX. Las rondas iniciales de selección SELEX se llevan a cabo con oligonucleótidos que contienen grupos fotorreactivos. Después de un número de rondas de SELEX, se realiza photoSELEX para seleccionar los oligonucleótidos capaces de unirse a la molécula diana.

En otra disposición se describe la producción de un aptámero que incluye una sección escindible o liberable (también descrito como un elemento o componente) en la secuencia del aptámero. Estos componentes o elementos adicionales son elementos o componentes estructurales que introducen una funcionalidad adicional en el aptámero y, por lo tanto, son elementos o componentes funcionales. El aptámero se produce además con uno o más de los siguientes componentes adicionales (también descrito como un elemento o componente o resto funcional o estructural en cualquier combinación de estos términos): un componente marcado o detectable, un componente espaciador y un marcador de unión específica o elemento de inmovilización o componente.

Como se ha indicado en lo que antecede, la presente divulgación proporciona métodos para identificar aptámeros que se unen a moléculas diana y una vez unidos tienen velocidades de disociación o tasas de disociación lentas. Las velocidades de disociación lentas obtenidas con este método pueden superar una semivida de aproximadamente una hora y de tanto como de aproximadamente 240 minutos, es decir, una vez que se genera un conjunto de complejos ácido nucleico-diana, la mitad de los complejos en el conjunto permanecen unidos después de una hora. Debido a que el efecto de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta depende de las diferentes velocidades de disociación de los complejos de afinidad del aptámero, la duración del proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se elige de un modo tal que conserve una alta proporción de complejos de afinidad del aptámero con velocidades de disociación lenta, al tiempo que se reduce sustancialmente el número de complejos de afinidad del aptámero con velocidades de disociación rápida. Por ejemplo, la incubación de la mezcla durante períodos relativamente largos de tiempo después de imponer el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta seleccionará aptámeros con velocidades de disociación más largas que los aptámeros seleccionados utilizando el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta con períodos de incubación más cortos.

En diversas disposiciones, la mezcla candidata se mezcla con una cantidad de la molécula diana y se permite establecer el equilibrio de unión con la molécula diana. Antes de la repartición de los ácidos nucleicos unidos a la diana de aquellos libres en solución, se impone un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para enriquecer la población unida en velocidades de disociación lenta. Como se ha indicado anteriormente, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se puede aplicar mediante la adición de una molécula competidora, por dilución de la muestra, por una combinación de dilución de la muestra en presencia de una molécula competidora. Por tanto, en una disposición, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se aplica mediante la introducción de moléculas competidoras en la mezcla que contiene los complejos ácido nucleico-diana e incubando la mezcla durante un cierto período de tiempo antes de la separación de los ácidos nucleicos unidos. La cantidad de moléculas competidoras es generalmente de al menos un orden de magnitud mayor que la de las moléculas de ácido nucleico y puede ser dos o más órdenes de magnitud mayor. En otra realización, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se aplica mediante dilución de la mezcla de la muestra de los complejos ácido nucleico-diana varias veces (por ejemplo, al menos aproximadamente uno de 2x, 3x, 4x, 5x) en volumen e incubando la mezcla durante un cierto período de tiempo antes de la separación de los ácidos nucleicos unidos. El volumen de dilución es generalmente al menos un orden de magnitud mayor, y puede ser aproximadamente dos o más órdenes de magnitud mayor, que el volumen original. En otra realización más, se usa una combinación de las moléculas competidoras y la dilución para aplicar el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta. En otra realización, las mezclas candidatas que se ha demostrado que dan lugar a una mayor frecuencia de aptámeros de disociación lenta se utilizan para seleccionar un número de aptámeros candidatos. Estos aptámeros se someten a detección selectiva para identificar aptámeros de velocidad de disociación lenta.

En otra disposición se produce un aptámero de velocidad de disociación lenta que incluye una sección escindible o liberable en la región fija del aptámero. El aptámero se puede producir también con uno o más de los siguientes componentes adicionales: un componente marcado, un componente espaciador y un marcador de unión específica. Cualquiera o todos estos elementos se pueden introducir en un aptámero monocatenario. En una disposición, el elemento se introduce en el extremo 5' del aptámero. En otra disposición, uno o más de estos elementos se incluye mediante la creación de un aptámero parcialmente bicatenario, en el que una hebra contiene los diversos elementos deseados, así como una secuencia complementaria a una de las secciones de secuencia fija de la segunda hebra que contienen la región variable de unión a la diana.

Un elemento o componente o resto "liberable" o "escindible" se refiere a un grupo funcional en el que ciertos enlaces en el grupo funcional se pueden romper para producir 2 componentes separados. En diversas disposiciones, el grupo funcional puede escindirse mediante la irradiación del grupo funcional (fotoescindible) a la longitud de onda adecuada o mediante el tratamiento con los reactivos enzimáticos o químicos apropiados. En otra realización, el

elemento liberable puede ser un enlace disulfuro que puede tratarse con un agente reductor para romper la unión. El elemento liberable permite a un complejo de afinidad aptámero/diana que se une a un soporte sólido que se separa del soporte sólido, tal como por elución del complejo. El elemento liberable puede ser estable en las condiciones del resto del ensayo y puede ser liberable en condiciones que no rompan el complejo de aptámero/diana.

5 Como se divulga en el presente documento, un aptámero puede comprender, además, un "marcador" o "componente o elemento de inmovilización" o "componente o elemento de unión específica" que se refiere a un componente que proporciona un medio para unir o inmovilizar un aptámero (y cualquier molécula diana unida al mismo) a un soporte sólido. Una "marcador" es un conjunto de copias de un tipo o especie de componente que es capaz de asociarse con una sonda. "Marcadores" hace referencia a más de uno de estos conjuntos de componentes. El marcador se puede unir a o incluir en el aptámero mediante cualquier método adecuado. Generalmente, el marcador permite que el aptámero se asocie, ya sea directa o indirectamente, con una sonda o receptor que está unido al soporte sólido. La sonda puede ser altamente específica en su interacción con el marcador y retiene dicha asociación durante todos los pasos o procedimientos de procesamiento posteriores. Un marcador puede permitir la localización de un complejo de afinidad del aptámero (o complejo de afinidad del aptámero covalente opcional) a una dirección definida espacialmente sobre un soporte sólido. Por tanto, diferentes marcadores pueden permitir la localización de diferentes complejos covalentes del aptámero a diferentes direcciones espacialmente definidas sobre un soporte sólido. Un marcador puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un mimético de anticuerpo, un receptor celular, un ligando, un lípido, biotina, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otra estructura con la que una sonda (o molécula de unión, tal como se describe a continuación) pueda diseñarse configurarse para que se una o, de otro modo, asocie con especificidad. Generalmente, un marcador está configurado de tal manera que no interacciona intramolecularmente consigo mismo o con el aptámero a la que está unido o del que forma parte. Si SELEX se utiliza para identificar un aptámero, el marcador se puede añadir a la aptámero antes o después de SELEX. El marcador se incluye en el extremo 5' del aptámero después de SELEX, o el marcador se incluye en el extremo 3' del aptámero después de SELEX, o los marcadores se pueden incluir tanto en el extremo 3' como 5' de los aptámeros en un proceso después de SELEX.

30 Como se ilustra en la FIG. 8D, un colorante fluorescente (tal como Cy3), los restos fotoescindibles y de biotina se añaden todos al final del aptámero. Debido a las posibles interacciones entre el resto fotoescindible y el colorante, se inserta un espaciador entre estos dos restos. Todas las construcciones se pueden sintetizar usando química de fosforamidita estándar. Construcciones de aptámeros representativas se muestran en la FIG. 9A a FIG. 9F. La funcionalidad se puede dividir entre el extremo 5' y 3' o combinarse en cualquier extremo. Además de los restos fotoescindibles, pueden usarse otros restos escindibles, incluyendo restos química o enzimáticamente escindibles. Se pueden usar diversos restos espaciadores y se pueden incluir uno o más restos de biotina. Los marcadores (también conocidos como elementos o componentes de unión específica o inmovilización) distintos de biotina también se pueden incorporar. Reactivos de construcción adecuados incluyen biotina fosforamidita, enlazador PC (Glen Research 10-4920-02 PN); fosforamidita de biotina PC (Glen Research 10-4950-02 PN); espaciador de fosforamidita CE (Glen Research 10-1914-02 PN); fosforamidita Cy3 (Glen Research 10-5913-02 PN); y espaciador Arm26-Ach de amidita (Fidelity Systems PN SP26Ach-05).

En una realización, se usan modificaciones de bases de los nucleótidos en la producción de la región variable del aptámero. Se ha demostrado que estos nucleótidos modificados producen aptámeros que tienen velocidades de disociación muy lentas a sus dianas.

En los métodos de la presente divulgación, la mezcla candidata puede comprender ácidos nucleicos modificados en los que uno, varios (por ejemplo, uno de, o al menos uno de, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) o todas las pirimidinas en al menos un, o cada uno, ácido nucleico de la mezcla candidata se modifica químicamente en la posición 5. Opcionalmente, todos los residuos C en los ácidos nucleicos de la mezcla candidata se modifican químicamente en la posición 5. Opcionalmente, todos los residuos T en los ácidos nucleicos de la mezcla candidata se modifican químicamente en la posición 5. Opcionalmente, todos los residuos U en los ácidos nucleicos de la mezcla candidata se modifican químicamente en la posición 5.

En otra disposición, los aptámeros de velocidad de disociación lenta se mezclan o se exponen a una muestra. Se deja que el aptámero velocidad de disociación lenta reaccione con, o se una a, su diana específica en la muestra para formar un complejo. Se pueden usar diversos métodos para detectar tanto la diana o el aptámero. La diana puede detectarse en el complejo o en el momento de la liberación del complejo. El aptámero puede detectarse en el complejo o en el momento de la liberación del complejo. El complejo aptámero/diana puede usarse para aislar la diana específica de otros componentes en la muestra de ensayo. Se pueden usar múltiples aptámeros cuando se desea un ensayo de multiplexado para la detección de varias dianas. El método de la presente descripción se ilustra en general en los Ejemplos 1-7.

El método de la presente divulgación se ilustra en general en los Ejemplos 1-6. El Ejemplo 1 describe el método SELEX de afinidad general usando una mezcla candidata compuesta por nucleótidos modificados. El Ejemplo 2 describe un método photoSELEX usando una mezcla candidata compuesta por nucleótidos modificados y un grupo

fotorreactivo en 5'-terminal, y el método SELEX mejorado en el que se utiliza dilución para proporcionar el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para la mezcla equilibrada de aptámero : diana. Ejemplo 3 se extiende el método descrito en el Ejemplo 2 mediante la adición de un competidor a la etapa de dilución. El Ejemplo 4 ilustra la eficacia del proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta. El valor de la semivida de disociación promedio ($t_{1/2}$) para los aptámeros utilizando los nucleótidos modificados 5-bencil-dUTP (BzdUTP), 5-isobutil-dUTP (iBdUTP) o 5-triptamino-dUTP seleccionados en ausencia de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de 20 minutos con algunos aptámeros que tienen un valor $t_{1/2}$ de hasta una hora. Este es sustancialmente más largo que lo que se ha descrito previamente con bases naturales u otros nucleótidos modificados. El promedio para los aptámeros seleccionados con un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de más de 85 minutos. Más específicamente, con referencia a la figura 3B, se puede ver que la introducción de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta produjo aptámeros con valores de $t_{1/2}$ de aproximadamente ≥ 30 minutos, ≥ 60 minutos, ≥ 90 minutos, ≥ 120 min. ≥ 150 minutos, ≥ 180 minutos, ≥ 210 y ≥ 240 min. Estas tasas de disociación para los complejos aptámero: diana no tienen precedentes.

El Ejemplo 5 describe la generación de aptámeros de velocidad de disociación lenta utilizando una mezcla candidata de NpdUTP.

El Ejemplo 6 describe la generación de un aptámero de velocidad de disociación lenta a un péptido diana.

Ejemplos

Los procedimientos siguientes se proporcionan para fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1. La incorporación de nucleótidos modificados en bibliotecas de ácidos nucleicos conduce a bibliotecas enriquecidas de afinidad más alta en SELEX de afinidad

A. Preparación de mezclas candidatas

Las mezclas candidatas se prepararon con dATP, dGTP, 5-metil-dCTP (MedCTP) y, o bien dTTP o uno de los tres análogos de dUTP: 5-Bencil-dUTP (BzdUTP), 5-isobutil-dUTP (iBdUTP), o 5-triptamino-dUTP (TrpdUTP). Las mezclas candidatas se prepararon mediante extensión con polimerasa de un cebador hibridado a un molde biotinilado (Fig. 2). Para cada composición de la mezcla candidata, se combinaron 4,8 nmol del cebador directo de PCR y 4 nmol del molde en 100 μ l de tampón de ADN polimerasa 1X KOD ADN (Novagen), se calentó a 95 °C durante 8 minutos, y se enfrió en hielo. Cada 100 μ l de la mezcla cebador:molde se añadió a una reacción de extensión de 400 μ l que contiene tampón de ADN polimerasa 1X KOD ADN, 0,125 U/ μ l de ADN polimerasa KOD DNA y 0,5 mM de cada dATP, MedCTP, dGTP, y dTTP o análogo de dUTP y se incubó a 70 °C, 30 minutos. El producto bicatenario se capturó a través de las biotinas de la hebra molde mediante la adición de 1 ml de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina ml (MagnaBind estreptavidina, Pierce, 5 mg/ml en NaCl 1M + 0,05 % de Tween-20) y la incubación a 25 °C durante 10 minutos con mezclado. Las esferas se lavaron tres veces con 0,75 ml de tampón SB1T (HEPES 40 mM a pH 7,5, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, 0,05 % de Tween-20). La hebra del aptámero se eluyó de las esferas con 1,2 ml de NaOH 20 mM, se neutralizó con 0,3 ml de HCl 80 mM y se tamponó con 15 μ l de HEPES 1M a pH 7,5. Mezclas candidatas se concentraron con un Centricon-30 hasta aproximadamente 0,2 ml y se cuantificaron mediante espectroscopia de absorbancia UV.

B. Inmovilización de proteínas diana

Las proteínas diana se adquirieron con marcadores de poli His, tales como marcadores (His)₆ (R & D Systems) y se inmovilizaron en esferas paramagnéticas de Co⁺²-NTA (TALON, Invitrogen). Las proteínas diana se diluyeron a 0,2 mg/ml en 0,5 ml de tampón B/W (Na-fosfato 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, 0,01 % de Tween-20), y se añadieron a 0,5 ml de esferas TALON (prelavadas tres veces con tampón B/W y resuspendidas hasta 10 mg/ml en tampón B/W). La mezcla se hizo girar durante 30 minutos a 25 °C y se almacenó a 4 °C hasta su uso. También se prepararon esferas TALON recubiertas con péptido (His)₆ y se almacenaron como anteriormente. Antes de usar, las esferas se lavaron 3 veces con tampón B/W, una vez con SB1T, y se resuspendieron en SB1T.

C. Esquema de selección del aptámero

Las selecciones de afinidad se realizaron por separado con cada mezcla candidata, comparando la unión entre las esferas de proteína diana (señal, S) y esferas (His)₆(fondo, B). Para cada muestra, una mezcla candidata de ADN 0,5 μ M se preparó en 40 μ l de SB1T. Se añadió 1 μ l del (His)₆-complemento oligo (1 mM) (FIG. 2) al ADN, junto con 10 μ l de una mezcla competidora de proteínas (0,1 % de HSA, caseína 10 μ M y protrombina 10 μ M en SB1T).

Las reacciones de unión se realizaron mediante la adición de 50 μ l de esferas recubiertas con proteína diana o esferas recubiertas con (His)₆ (5 mg/ml en SB1T) a la mezcla de DNA e incubando a 37 °C durante 15 minutos con mezcla. La solución de ADN se eliminó y las esferas se lavaron 5 veces a 37 °C con SB1T que contiene 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque (Sigma-Aldrich). Salvo que se indique, todos los lavados se realizaron

resuspendiendo las esferas en 100 µl de solución de lavado, mezclando durante 30 segundos, separando las esferas con un imán y eliminando la solución de lavado. Los aptámeros unidos se eluyeron de las esferas mediante la adición de 100 µl de SB1T + guanidina-HCl 2M y la incubación de 37 °C, 5 minutos con mezcla. El eluato del aptámero se transfirió a un nuevo tubo después de la separación magnética. Después de las dos primeras rondas de selección, los últimos dos cinco lavados de esferas diana se realizaron durante 5 minutos en lugar de 30 segundos.

Las esferas de cebador se prepararon mediante la inmovilización de cebador inverso de PCR biotinilado a esferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (MyOne-SA, Invitrogen). 5 ml de esferas MyOne-SA (10 mg/ml) se lavaron una vez con NaCl 5 M, 0,01 % de Tween-20 y se resuspendieron en 5 ml del cebador inverso biotinilado para PCR (5 µM en NaCl). La muestra se incubó a 25 °C, 15 minutos, se lavó dos veces con 5 ml de NaCl, se resuspendió en 12,5 ml de NaCl (4 mg/ml), y se almacenó a 4 °C.

25 µl de esferas de cebador (4 mg/ml en NaCl) se añadieron a los 100 µl de la solución de aptámero de tampón de guanidina y se incubaron a 50 °C, 15 minutos con mezcla. La solución de aptámero se eliminó y las esferas se lavaron 5 veces con SB1T. El aptámero se eluyó de las esferas mediante la adición de 85 µl de NaOH 20 mM y la incubación a 37 °C, 1 minuto con mezclado. 80 µl del eluato del aptámero se transfirió a un nuevo tubo después de la separación magnética, se neutralizó con 20 µl de HCl 80 mM y se tamponó con 1 µl de Tris-HCl 0,5 M a pH 7,5.

D. Amplificación y purificación del aptámero

El ADN del aptámero seleccionado se amplificó y se cuantificó mediante QPCR. Se añadieron 48 µl de ADN a 12 µl de la mezcla QPCR (5x tampón de ADN polimerasa KOD, MgCl₂ 25 mM, cebador directo para PCR 10 µM, cebador inverso biotinilado para PCR 10 µM, 5X de verde SYBR I, 0,125 U/µl de ADN polimerasa KOD y 1 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) y se termocicló en un instrumento ABI5700 con el QPCR siguiente protocolo: 1 ciclo de 99,9 °C, 15 segundos, 55 °C, 10 segundos, 70 °C, 30 minutos; 30 ciclos de 99,9 °C, 15 segundos, 72 °C, 1 minuto. La cuantificación se realizó con el software del instrumento y el número de copias de ADN seleccionadas con las esferas diana y las esferas (His)₆ se compararon para determinar las relaciones señal/fondo.

Después de la amplificación, el producto PCR se capturó sobre esferas MyOne-SA a través de la cadena antisentido biotinilada. 1,25 ml de las esferas MyOne-SA (10 mg/ml) se lavaron dos veces con 0,5 ml de NaOH 20 mM, una vez con 0,5 ml SB1T, se resuspendieron en 2,5 ml de NaCl 3 M, y se almacenaron a 4 °C. 25 µl de esferas MyOne-SA (4 mg/ml en NaCl 3 M) se añadieron a 50 µl del producto de QPCR bicatenario y se incubaron a 25 °C, 5 minutos con mezcla. Las esferas se lavaron una vez con SB1T, y la hebra "sentido" se eluyó de las esferas mediante la adición de 200 µl de NaOH 20 mM y la incubación a 37 °C, 1 minuto con mezclado. La hebra eluida se desechó y las esferas se lavaron 3 veces con SB1T y una vez con NaCl 16 mM.

La hebra sentido aptámero se preparó con la composición de nucleótidos apropiada mediante extensión del cebador a partir de la hebra antisentido inmovilizada. Las esferas se resuspendieron en 20 µl de la mezcla de reacción de extensión del cebador (1X tampón de ADN polimerasa KOD, MgCl₂ 1,5 mM, cebador directo para PCR 5 mM, 0,125 U/µl de ADN polimerasa KOD, 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP o análogo de dUTP) y se incubaron a 68 °C, 30 minutos con mezcla. Las esferas se lavaron 3 veces con SB1T, y la hebra del aptámero se eluyó de las esferas mediante la adición de 85 µl de NaOH 20 mM y la incubación a 37 °C, 1 minuto con mezclado. 80 µl del eluato del aptámero se transfirió a un nuevo tubo después de la separación magnética, se neutralizó con 20 µl de HCl 80 mM y se tamponó con 5 µl de HEPES 0,1 M a pH 7,5.

E. Rigurosidad de selección y retroalimentación

La concentración relativa de la proteína diana de la etapa de selección se redujo cada ronda en respuesta a la relación S/B de la siguiente manera, donde la señal S y el fondo B se definen en la Sección C anterior:

$$\text{si } S/B < 10, [P]_{(i+1)} = [P]_i$$

$$\text{si } 10 \leq S/B < 100, [P]_{(i+1)} = [P]_i/3,2$$

$$\text{si } S/B \geq 100, [P]_{(i+1)} = [P]_i/10$$

donde [P] = concentración de proteína e i = Número actual de ronda.

La concentración de la proteína diana se redujo mediante el ajuste de la masa de las esferas de proteínas diana (y esferas (His)₆ para la determinación de fondo) añadidas a la etapa de selección.

Después de cada ronda de selección, se determinó el estado de convergencia de la mezcla de ADN enriquecida. 5 µl del producto QPCR de doble hebra se diluyó hasta 200 µl con MgCl₂ 4 mM que contiene 1X Verde SYBR I. Las muestras se cubrieron con 75 µl de aceite de silicio y se analizaron para determinar la convergencia utilizando un análisis C₀t que mide el tiempo de hibridación para mezclas complejas de oligonucleótidos de doble cadena. La muestra se termocicló con el siguiente protocolo: 3 ciclos de 98 °C, 1 minuto, 85 °C, 1 minuto; 1 ciclo de 93 °C, 1

minuto, 85 °C, durante 15 minutos. Durante los 15 minutos a 85 °C, las imágenes fluorescentes se miden a intervalos de 5 segundos. La intensidad de fluorescencia se representa gráficamente como una función de log (tiempo) para evaluar la diversidad de las secuencias.

5 F. Medición de la constante de unión en equilibrio constante (K_d)

Las constantes de unión en equilibrio de las bibliotecas enriquecidas se midieron utilizando la repartición en esferas TALON. El ADN se renaturalizó por calentamiento a 95 °C y enfriando lentamente a 37 °C. Los complejos se formaron mezclando una concentración baja de ADN radiomarcado ($\sim 1 \times 10^{-11}$ M) con un intervalo de concentraciones de la proteína diana (1×10^{-7} M a 1×10^{-12} M final) en tampón SB1 (descrito anteriormente) e incubando a 37 °C. Una porción de cada reacción se transfirió a una membrana de nylon y se secó para determinar los recuentos totales en cada reacción. Una cantidad pequeña de 5 mg/ml de esferas MyOne TALON (Invitrogen) se añadió al resto de cada reacción y se mezcló a 37 °C durante un minuto. Una porción se pasó a través de una placa MultiScreen HV Plate (Millipore) al vacío para separar los complejos unidos a proteína del ADN no unido y se lavó con 100 μ l de tampón SB1. Las membranas de nylon y las placas MultiScreen HV se sometieron a imagen con fósforo y la cantidad de radioactividad en cada muestra se cuantificó utilizando una FUJI FLA-3000. La fracción de ADN capturado se representó gráficamente como una función de la concentración de proteína y se usó un algoritmo de ajuste de curva no lineal para extraer las constantes de unión en equilibrio (valores de K_d) a partir de los datos. La Tabla 1 muestra los valores de K_d determinados para cada mezcla candidata enriquecida a un conjunto de dianas. NA indica que la biblioteca enriquecida para una composición de base particular no parecía haber cambiado con respecto a la mezcla candidata original, tal como se determina mediante análisis C_{ot} (descrito anteriormente) y, por lo tanto, era No Analizado (NA).

La Tabla 1 muestra las constantes de unión en equilibrio (K_d) para conjuntos enriquecidos a quince dianas proteicas diferentes y cuatro bibliotecas de ADN diferentes: bases de origen natural (dT), bencilo (BzdU), isobutilo (IBDU) o triptófano (TrpdU). Aptámero nAn con una K_d de menos de 1×10^{-8} es deseable. El uso de bases modificadas en el proceso SELEX produce un porcentaje significativamente mayor de aptámeros de alta afinidad deseables. Se observó que sólo 2 de los 14 aptámeros producidos con los nucleótidos normales tienen las tasas de disociación lenta deseables. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta producidos con los nucleótidos modificados se identificaron 9 de 14, 7 de 14, y 14 de 14 para BzdUTP, iBdUTP y TRPdUTP, respectivamente.

Tabla 1. Constantes de unión en equilibrio (K_d) de las bibliotecas enriquecidas seleccionadas con diferentes nucleótidos modificados, indicadas en unidades de molaridad. NA = no analizado.

Proteína diana	dTTP	BzdUTP	iBdUTP	TrpdUTP
4-1BB	> 1,0 e-07	5,6 e-09	> 1,0 e-07	3,9 e-09
B7	> 1,0 e-07	1,1 e-08	NA	7,2 e-09
B7-2	> 1,0 e-07	NA	> 1,0 e-07	5,7 e-09
CTLA-4	> 1,0 e-07	NA	NA	1,4 e-09
E-Selectina	> 1,0 e-07	> 1,0 e-07	> 1,0 e-07	1,9 e-09
Fractalkina	NA	> 1,0 e-07	NA	5,1 e-11
Proteína GA733-1	8,9 e-09	2,8 e-09	4,7 e-09	4,5 e-10
Gp130	> 1,0 e-07	5,9 e-09	2,2 e-08	1,2 e-09
HMG-1	> 1,0 e-07	NA	2,2 e-08	4,9 e-09
IR	> 1,0 e-07	1,9 e-09	1,2 e-08	2,2 e-10
OPG	3,7 e-08	4,6 e-09	9,5 e-09	1,7 e-10
PAI-1	> 1,0 e-07	3,7 e-10	9,1 e-10	4,3 e-10
P-Caderina	> 1,0 e-07	3,5 e-09	5,2 e-09	2,7 e-09
sLeptina R	> 1,0 e-07	2,3 e-09	NA	4,6 e-10

35 EJEMPLO 2. Generación de fotoaptámeros utilizando PhotoSELEX fijado en 5' y proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta mediante dilución

A. Preparación de mezclas candidatas

40 Las mezclas candidatas que contienen dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP se prepararon por extensión con polimerasa de un cebador hibridado un molde biotinilado (Fig. 4A-B). Para cada molde se usaron cuatro cebadores directos diferentes, cada uno con un cromóforo único en el extremo 5' (FIG. 5). Para cada mezcla candidata se combinaron 11 nmol del cebador directo (con cromóforo en 5') y 10 nmol del molde en 250 μ l del tampón de extensión del cebador (Tris-HCl 120 mM, pH 7,8, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 mM, MgSO_4 7 mM, 0,1 mg/ml de BSA, 0,1 % Triton X-

100), se calentó a 95 °C durante 5 minutos, y se enfrió en hielo. 125 µl cada mezcla cebador: molde se añadieron a 1 ml de la reacción de extensión que contiene cebador tampón de extensión del cebador, 0.125 U/ µl de ADN polimerasa KOD y 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP, y se incubaron a 70 °C, 30 minutos. Cada 1 ml de reacción se dividió en cuatro alícuotas de 250 µl y enfrió en hielo. El producto bicatenario se capturó a través de las biotinas de la hebra molde mediante la adición de 1 ml de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina ml (MagnaBind estreptavidina, Pierce, 5 mg/ml en NaCl 1M + 0,05 % de Tween-20) a cada alícuota de 250 µl y la incubación a 25 °C durante 60 minutos con mezclado. Las esferas se lavaron tres veces con 0,5 ml de tampón SB17T (HEPES 40 mM a pH 7,5, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, 0,05 % de Tween-20). La hebra del aptámero se eluyó de las esferas con 1 ml de NaOH 20 mM, se neutralizó con 0,25 ml de HCl 80 mM y se tamponó con 10 µl de HEPES 1M a pH 7,5. Mezclas candidatas se concentraron con un Centricon-30 hasta aproximadamente 0,2 ml y se cuantificaron mediante espectroscopia de absorbancia UV.

B. Preparación de proteínas diana

Las proteínas diana sin marcar se biotinizaron mediante acoplamiento covalente de NHS-PEO4-biotina (Pierce) a restos de lisina. Las proteínas (300 pmol en 50 µl) se intercambiaron en SB17T con una columna de microespín Sephadex G-25. Se añadió NHS-PEO4-biotina a 1,5 mM y la reacción se incubó a 4 °C durante 16 horas. La NHS-PEO4-biotina sin reaccionar se eliminó con una columna de microespín Sephadex G-25.

C. Selección del aptámero con el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotorreticulación

Las selecciones se realizaron por separado con cada mezcla candidata comparando la unión entre las muestras con proteína diana (señal S) y las muestras sin proteína diana (fondo B). Las tres primeras rondas se realizaron con la selección de afinidad (sin fotorreticulación); la segunda y la tercera incluyeron un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta. Las rondas cuarta a octava incluyeron tanto el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta como fotorreticulación.

Para cada muestra se preparó una mezcla de 90 µl de ADN en SB17T con 10-20 pmoles de mezcla candidata (100 pmoles en la primera ronda) y 100 pmoles de cebador inverso. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 3 minutos y se enfriaron a 37 °C a una velocidad de 0,1 °C/segundo. Las muestras se combinaron con 10 µl de mezcla de proteína competidora (0,1 % de HSA, caseína 10 mM y protrombina 10 mM en SB17T), añadidos a 0,5 mg de esferas Dynal MyOne estreptavidina (prelavadas dos veces con NaOH 20 mM y una vez con SB17T), y incubaron a 37 °C durante 5 minutos con mezclado. Las esferas se eliminaron mediante separación magnética.

Las reacciones de unión se realizaron mediante la adición de 10 µl de proteína diana (0,5 µM en SB17T) o SB17T a 40 µl de la mezcla de ADN e incubando a 37 °C durante 30 minutos.

Cuando se empleó el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta, las muestras se diluyeron 20 veces mediante la adición de 950 µl de SB17T (precalentado a 37 °C) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de la captura de complejos.

Complejos se capturaron en esferas SA a través de biotinas proteínas mediante la adición de 0,25 mg de esferas MyOne-SA (Invitrogen) e incubando a 37 °C durante 15 minutos con mezclado. El ADN libre se eliminó mediante lavado de las esferas cinco veces con SB17T. Salvo que se indique, todos los lavados se realizaron resuspendiendo las esferas en 100 µl de solución de lavado, mezclando durante 30 segundos a 25 °C, separando las esferas con un imán y eliminando la solución de lavado. La hebra del aptámero se eluyó de las esferas mediante la adición de 85 µl de NaOH 20 mM y la incubación da 37 °C, 1 minuto con mezclado. 80 µl del eluato del aptámero se transfirió a un nuevo tubo después de la separación magnética, se neutralizó con 20 µl de HCl 80 mM y se tamponó con 1 µl de Tris-HCl 0,5 M a pH 7,5.

Cuando se empleó fotoselección, las reacciones de unión de 50 µl (o 1 ml de reacciones después del proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta opcional mediante dilución) se irradiaron desde arriba con una lámpara de mercurio de alta presión (Optical Associates, Inc. modelo 0131- 0003-01, 500W, con un conjunto de espejos de 310 nm). Las mezclas de candidatas que poseen un cromóforo BrdU se irradiaron durante 37 segundos, aquellas que poseen un cromóforo ANA se irradiaron durante 60 segundos, y aquellas que poseen un cromóforo AQ o psoraleno se irradiaron durante 10 minutos. Se usó un filtro adicional (5 mm placa de vidrio) para el ANA, AQ y cromóforos de psoraleno para eliminar las longitudes de onda por debajo de 320 nm innecesarias pero potencialmente perjudiciales. Los complejos se capturaron como anteriormente, y el ADN no reticulado se eliminó por lavado de las esferas una vez con guanidina-HCl 4M + 0,05 % de Tween-20 a 50 °C durante 10 minutos, una vez con NaOH 20 mM a 25 °C durante 2 minutos, dos veces con SB17T, y una vez con NaCl 16 mM. El ADN reticulado no se retiró de la superficie de la esfera para las etapas de amplificación.

D. Amplificación y purificación del aptámero

El ADN del aptámero seleccionado se amplificó y se cuantificó mediante QPCR. Se añadieron 48 µl de ADN a 12 µl de la mezcla QPCR (5x tampón de ADN polimerasa KOD, MgCl₂ 25 mM, cebador directo para PCR 10 µM, cebador

inverso biotinilado para PCR 10 μM , 5X de verde SYBR I, 0,125 U/ μl de ADN polimerasa KOD y 1 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) y se termocicló en un instrumento Bio-Rad MyIQ QPCR con el QPCR siguiente protocolo: 1 ciclo de 99,9 $^{\circ}\text{C}$, 15 segundos, 55 $^{\circ}\text{C}$, 10 segundos, 68 $^{\circ}\text{C}$, 30 minutos; 30 ciclos de 99,9 $^{\circ}\text{C}$, 15 segundos, 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto. Para las rondas photoSELEX, se lleva a cabo la incubación inicial de 30 minutos. La cuantificación se realizó con el software del instrumento y el número de copias de ADN seleccionados con y sin proteína diana se compararon para determinar las relaciones señal/fondo.

Cuando se empleó fotoselección, una copia de ADNc del ADN seleccionado se preparó mediante extensión del cebador en la superficie de la esfera. Las esferas lavadas se resuspendieron en 20 μl de la mezcla de extensión de ADNc (tampón de extensión del cebador que contiene cebador inverso de PCR 5 μM , 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, y 0,125 U/ μl de ADN polimerasa KOD) y se incubaron a 68 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos con mezclado. Las esferas se lavaron 3 veces con SB1T, y la hebra del aptámero se eluyó de las esferas mediante la adición de 85 μl de NaOH 20 mM y la incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto con mezclado. 80 μl del eluato del aptámero se transfirió a un nuevo tubo después de la separación magnética, se neutralizó con 20 μl de HCl 80 mM y se tamponó con 1 μl de Tris-HCl 0,5 M a pH 7,5. El ADNc se amplificó y se cuantificó mediante QPCR como anteriormente para los 30 ciclos de 99,9 $^{\circ}\text{C}$, 15 segundos, 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto.

Después de la amplificación, el producto PCR se capturó sobre esferas MyOne-SA a través de la cadena antisentido biotinilada. 1,25 ml de las esferas MyOne-SA (10 mg/ml) se lavaron dos veces con 0,5 ml de NaOH 20 mM, una vez con 0,5 ml SB1T, se resuspendieron en 1,25 ml de NaCl 3 M + 0,05 % de Tween, y se almacenaron a 4 $^{\circ}\text{C}$. 25 μl de esferas MyOne-SA (10 mg/ml en NaCl 3 M) se añadieron a 50 μl del producto de QPCR bicatenario y se incubaron a 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 minutos con mezcla. Las esferas se lavaron una vez con SB17T, y la hebra "sentido" se eluyó de las esferas mediante la adición de 200 μl de NaOH 20 mM y la incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto con mezclado. La hebra eluida se desechó y las esferas se lavaron 3 veces con SB17T y una vez con NaCl 16 mM.

La hebra sentido aptámero se preparó con el cromóforo apropiado mediante extensión del cebador a partir de la hebra antisentido inmovilizada. Las esferas se resuspendieron en 20 μl de la mezcla de reacción de extensión del cebador (1X tampón de extensión del cebador, MgCl_2 1,5 mM, cebador directo para PCR 5 μM con el cromóforo adecuado, 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP y 0,125 U/ μl de ADN Polimerasa KOD) y se incubaron a 68 $^{\circ}\text{C}$, 30 minutos con mezcla. Las esferas se lavaron 3 veces con SB17T, y la hebra del aptámero se eluyó de las esferas mediante la adición de 85 μl de NaOH 20 mM y la incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto con mezclado. 80 μl del eluato del aptámero se transfirió a un nuevo tubo después de la separación magnética, se neutralizó con 20 μl de HCl 80 mM y se tamponó con 5 μl de HEPES 0,1 M a pH 7,5.

E. Rigurosidad de selección y retroalimentación

La proteína diana se ajustó en cada ronda como se describe en el Ejemplo 1. Después de cada ronda de selección, el estado de convergencia del conjunto enriquecido se determinó como se describe en el Ejemplo 1.

F. Constantes de unión en equilibrio y bibliotecas enriquecidas

La afinidad de unión se determinó como se describe en el Ejemplo 1 anterior, pero con esferas de captura MyOne-SA. En la siguiente tabla, Tabla 2, se resumen las constantes de unión en equilibrio (K_d) obtenidas mediante el protocolo photoSELEX con proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta.

Tabla 2. Constantes de unión en equilibrio (K_d) de las bibliotecas enriquecidas seleccionadas con diferentes cromóforos, indicadas en unidades de molaridad. No se realizaron mediciones en las bibliotecas que no lograron converger (indicadas con una x).

Proteína diana	BrdU	AQ	ANA	Psor
β -catenina	2,7 e-08	3,6 e-09	1,1 e-09	1,6 e-09
bFGF	3,1 e-08	5,7 e-10	7,1 e-10	5,1 e-10
CMP-SAS	x	6,2 e-09	7,3 e-09	4,9 e-08
endostatina	1,3 e-09	8,7 e-10	8,8 e-10	1,3 e-09
IL-6	1,0 e-09	5,4 e-10	4,0 e-10	x
mieloperoxidasa	6,0 e-10	2,8 e-10	5,0 e-10	1,5 e-10
SDF-1 β	8,1 e-10	5,7 e-10	3,8 e-10	x
TIMP-1	5,2 e-09	7,3 e-09	8,9 e-09	x
VEGF	7,2 e-10	4,2 e-09	5,5 e-10	x
vWF	2,6 e-08	8,8 e-09	8,1 e-09	x

G. Ensayo de actividad de reticulación

El rendimiento de reticulación de las bibliotecas enriquecidas se determinó midiendo el porcentaje de ADN reticulado a la proteína en condiciones de saturación de la proteína y la luz. El ADN radiomarcado (50 pM) se mezcló con el cebador inverso (16 nM) en SB17T, se calentó a 95 °C durante 3 minutos, y se enfrió a 37 °C en 0,1 °C/segundo. La proteína diana se añadió a la mezcla de ADN a una concentración final de 10 nM y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se prepararon muestras control simultáneamente sin proteína. Las muestras se reticularon con las condiciones específica del cromóforo descritas anteriormente, pero con una dosis de saturación (6 minutos para BrdU, 10 minutos para ANA, y 30 minutos para AQ y Psor). Las muestras se analizaron mediante PAGE desnaturalizante, FIG. 6, y se cuantificaron y los resultados se tabulan en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimientos de reticulación de las bibliotecas enriquecidas seleccionadas con diferentes cromóforos, indicadas en unidades de porcentaje de ADN total reticulado con proteína. No se realizaron mediciones en las bibliotecas que no lograron converger (indicadas con una x).

Proteína diana	BrdU	AQ	ANA	Psor
β -catenina	15	9	8	1
bFGF	4	9	15	4
CMP-SAS	x	3	5	2
Endostatina	2	1	18	3
IL-6	0	5	9	
Mieloperoxidasa	4	13	9	8
SDF-1 β	8	10	17	x
TIMP-1	1	4	2	x
VEGF	1	1	4	x
vWF	2	2	7	x

EJEMPLO 3. Generación de aptámeros de velocidad de disociación lenta usando un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta con un competidor

A. Preparación de mezclas candidatas

Las mezclas candidatas que contienen dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP se prepararon por extensión con polimerasa de un cebador hibridado un molde biotinilado para 94 proteínas diana. Se combinaron 55 nmol del cebador directo (con cromóforo ANA en 5') y 55 nmol del molde en 0,5 ml del tampón de extensión del cebador (Tris-HCl 120 mM, pH 7,8, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, MgSO₄ 7 mM, 0,1 mg/ml de BSA, 0,1 % Triton X-100), se calentó a 95 °C durante 5 minutos, 70 °C durante 5 minutos, 48 °C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo. La mezcla cebador: molde se añadieron a 5,5 ml de la reacción de extensión que contiene cebador tampón de extensión del cebador, 0.125 U/ μ l de ADN polimerasa KOD y 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP, y se incubaron a 70 °C, 60 minutos. Después de la terminación de la reacción de extensión, la solución se enfrió en hielo. El producto bicatenario se capturó a través de las biotinas de la hebra molde mediante la adición al producto de extensión del cebador de 25 ml de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina ml (MagnaBind estreptavidina, Pierce, 5 mg/ml en NaCl 1M + 0,05 % de Tween-20) a cada alícuota de 250 μ l y la incubación a 25 °C durante 15 minutos con rotación. Las esferas se lavaron tres veces con 40 ml de tampón SB17T (HEPES 40 mM a pH 7,5, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, 0,05 % de Tween-20). La hebra aptámero se eluyó de las esferas con 35,2 ml de NaOH 20 mM durante 5 minutos con agitación. La hebra eluida se neutralizó con 8,8 ml de HCl 80 mM y se tamponó con 400 μ l de HEPES 1 M, pH 7,3. Mezclas candidatas se concentraron con un Centricon-30 hasta aproximadamente 0,7 ml y se cuantificaron mediante espectroscopia de absorbancia UV.

B. Preparación de proteínas diana

Las proteínas diana no marcadas se biotinilaron como se describe en el Ejemplo 2.

C. Selección del aptámero con el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotoreticulación

Las selecciones se realizaron por separado como se describe en el Ejemplo 2, con la adición de sulfato de dextrano 10 mM como competidor para la reunión del aptámero durante el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta en las rondas de seis a nueve.

El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se usó tres maneras diferentes. En las rondas dos y tres, las muestras se diluyeron 20 veces mediante la adición de 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de la captura de complejos. En las rondas cuatro y cinco, las muestras

se diluyeron 20 veces mediante la adición de 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de la reticulación. En las rondas seis y siete las muestras se diluyeron 20 veces mediante la adición de 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C). 50 μ l de cada muestra diluida se diluyó de nuevo mediante la transferencia de 950 μ l de SB17T + 5000K sulfato de dextrano 10 mM (precalentado a 37 °C) para dar una dilución 400X general, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos antes de la reticulación. En las rondas ocho y nueve, las muestras se diluyeron 20 veces mediante la adición de 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C), y 50 μ l de cada muestra se diluyó de nuevo mediante la transferencia de 950 μ l de SB 17T (precalentado a 37 °C) para dar la dilución 400X. Por último, 50 μ l de cada muestra diluida 400X se diluyó de nuevo mediante la transferencia de 950 μ l de SB17T + 5000K sulfato de dextrano 10 mM (precalentado a 37 °C) para dar una dilución 8.000X general, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos antes de la reticulación. Los complejos se capturaron y se lavaron como se describe en el Ejemplo 2. Cuando se empleó fotorreticulación, las reacciones de unión de 1 ml después del proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se irradiaron desde arriba con una matriz de LED de 470 nm durante 60 segundos antes de la captura complejo como en el Ejemplo 2.

D. Amplificación y purificación del aptámero

La amplificación y purificación se realizaron como en el Ejemplo 2.

E. Rigurosidad de selección y retroalimentación

La proteína diana se ajustó en cada ronda como se describe en el Ejemplo 1, excepto en las rondas seis y ocho. Con el fin de maximizar la señal después de estas grandes diluciones, la proteína diana se aumentó a 100 nM para las rondas seis y ocho. Después de cada ronda de selección, el estado de convergencia del conjunto enriquecido se determinó como se describe en el Ejemplo 1.

F. Protocolo de determinación de la constante de disociación

La constante de la velocidad para la disociación del complejo aptámero: proteína (Koff) se determinó para cada aptámero mediante la medición de la fracción de complejo aptámero: proteína preformada que permanecía unida tras la dilución como una función del tiempo. El aptámero radiomarcado (50 pM) se equilibró en SB17T-0.002 (SB17T con Tween-20 reducido a 0,002 %) a 37 °C con la proteína a una concentración 10 veces mayor que el valor de la K_d medido. Las muestras se diluyeron 100 veces con SB17T-0,002 a 37 °C y se extrajeron alícuotas a diversos puntos temporales y se repartieron para separar el aptámero libre de los complejos proteína:aptámero. La repartición se llevó a cabo mediante la adición de resina ZORBAX (Agilent) a la muestra, la captura de los complejos en la resina, hacer pasar la muestra a través de una membrana DuraPore al vacío y el lavado de la resina con SB17T-0.002. Para las proteínas no capturadas de manera eficiente con la resina ZORBAX, el ensayo se realizó con la proteína biotinilada en SB17T y la repartición se llevó a cabo mediante la captura de complejos con esferas Dyanal MyOne-SA. La cantidad de complejo restante en cada punto de tiempo se determinó mediante la cuantificación del aptámero radiomarcado en la resina con un PhosphorImager FUJI FLA-3000. La fracción de complejo se representó gráficamente como una función del tiempo y la constante de velocidad de disociación (Koff) y el valor de la semivida de disociación ($t_{1/2}$) se determinaron ajustando los datos a una expresión analítica para la cinética de disociación bimolecular utilizando regresión no lineal.

G. Propiedades cinéticas de algunos aptámeros

En la siguiente tabla, Tabla 4, se resumen los valores de la semivida de disociación ($t_{1/2}$) obtenidos para los aptámeros seleccionados contra 10 dianas usando este protocolo.

Tabla 4. Valores de la semivida de disociación ($t_{1/2}$) de aptámeros utilizando el protocolo enriquecimiento de velocidad de disociación lenta competidor

Proteína diana $t_{1/2}$ (min)	
bFGF R	66
C3	164
catalasa	58
FGF-17	91
Fosfolipasa A2 del grupo IB	40
HB-EGF	49
HCC-4	143
IL-6 sR α	114
SAP	186
uPA	85

Ejemplo 4: El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta aumenta la semivida de disociación de aptámeros seleccionados

Los valores de semivida de disociación ($t_{1/2}$) se midieron y se representaron para 65 aptámeros que se seleccionaron por el método SELEX de afinidad descrito en el Ejemplo 1 o los métodos fotoSELEX descritos en la patente de EE.UU. N° 6.458.539 titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands" sin un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta (Fig.3A). También se midieron los valores y se representaron gráficamente para 72 aptámeros que se seleccionaron mediante proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta descrito en el Ejemplo 2 con un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta mediante dilución o dilución con competidor (Fig.3B). El valor $t_{1/2}$ promedio de para los aptámeros utilizando los nucleótidos modificados 5-bencil-dUTP (BzdUTP), 5-isobutil-dUTP (iBdUTP) o 5-triptamino-dUTP seleccionados en ausencia de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de 20 minutos con algunos aptámeros que tienen un valor $t_{1/2}$ de hasta una hora. Este es sustancialmente más largo que lo que se ha descrito previamente con bases naturales u otros nucleótidos modificados. El promedio para los aptámeros seleccionados con un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de más de 85 minutos, teniendo algunos aptámeros un valor de $t_{1/2}$ mayor de cuatro horas.

Ejemplo 5: Generación de aptámeros de una biblioteca aleatoria NpdUTP

A. Preparación de mezclas candidatas

Las mezclas candidatas que contienen dATP, dCTP, dGTP, y NpdUTP se prepararon como se describe en el Ejemplo 3, pero sin el grupo fotorreactivo 5'-ANA.

B. Inmovilización de proteínas diana

Las proteínas diana contenían un marcador (His) 6 y se capturaron con esferas de Co + 2-NTA como se describe en el Ejemplo 1.

C. Selección del aptámero con el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta

La selección de aptámeros se realizó como se describe en el Ejemplo 3, pero sin fotorreticulación.

D. Amplificación y purificación del aptámero

La amplificación y purificación se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

E. Rigurosidad de selección y retroalimentación

La rigurosidad de la selección y la retroalimentación se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

F. Propiedades del aptámero

Las constantes de unión en equilibrio (K_d) de cuatro aptámeros de esta selección se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5.

Constantes de unión en equilibrio (K_d) de aptámeros NpdUTP	
Proteína diana	K_d (M)
bFGF	1,1 e-9
Endostatina	2,0 e-10
TIMP-3	1,5 e-10
VEGF	7,2 e-10

EJEMPLO 6. Generación de aptámeros de velocidad de disociación lenta para una diana peptídica usando un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta con un competidor

A. Preparación de mezclas candidatas

Las mezclas de candidatos que contienen dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP se prepararon por extensión de la polimerasa de un cebador con un cromóforo 5'-ANA y se purificaron como se describe en el Ejemplo 3.

B. Selección del aptámero con el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotorreticulación

La selección del aptámero se realizó como se describe en el Ejemplo 3 con el péptido diana biotinilado de 29 aminoácidos SMAP29 (péptido antibacteriano meloide de oveja MAP-29, Anaspec).

C. Amplificación y purificación del aptámero

La amplificación y purificación se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

D. Rigurosidad de selección y retroalimentación

La rigurosidad de la selección y la retroalimentación se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

E. Propiedades del aptámero

La constante de unión en equilibrio (K_d) de un aptámero de esta selección fue $1,2e-8M$ (medido de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1). La semivida de disociación ($t_{1/2}$) de este aptámero fue de 69 minutos (medido de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 3). Los resultados se muestran en la FIG. 12A y la FIG. 12B.

EJEMPLO 7: CAPTURA DE HÍBRIDO POR ESFERAS DE AFINIDAD

Etapas 1: Ejemplo 7: Las mediciones de las proteínas en muestras de ensayo se habilitan mediante aptámeros con velocidades de disociación lentas

Etapas 1: La preparación de mezclas de aptámeros/cebador y aptámeros de muestras de ensayo con un marcador de detección Cy3 biotina (4 nM cada uno) se mezclan con un exceso de 3 veces de sonda de captura (oligonucleótido complementario a la región 3' fija del aptámero que contiene un marcador de biotina y elemento fotoescindible) en 1X SB17T y se calentaron a 95 °C durante 4 minutos y luego a 37 °C durante 13 minutos, y se diluyeron a 1:4 en 1X SB17T. 55 µl de la mezcla aptámero/cebador se añaden a una placa de microtitulación (Hybaid # AB-0407) y se selló con papel de aluminio. Las muestras de ensayo se preparan en una placa de microtitulación mediante la mezcla de concentraciones conocidas de los analitos de proteínas en SB 17T y diluyendo en serie con SB 17T.

Etapas 2: Equilibrado de la muestra

55 µl de la mezcla aptámero/cebador se añaden a 55 µl de la muestra de ensayo y se incuban a 37 °C durante 15 minutos en una placa de microtitulación sellada con papel de aluminio. La concentración final de cada aptámero en la mezcla de equilibrio es 0,5 nM. Después del equilibrado, todas las etapas posteriores de este método se realizan a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario.

Etapas 3: Captura de aptámero y eliminación de proteínas libres

Una placa de filtración Durapore (Millipore HV nº cat. MAHVN4550) se lavó una vez con 100 µl de SB17T por filtración al vacío, se añaden 133,3 µl. A cada pocillo se añade 7,5 % de resina de estreptavidina-agarosa (Pierce) y se lava dos veces con 200 µl de 1X SB17T. 100 µl de las muestras equilibradas se transfieren a la placa Durapore que contiene la resina de estreptavidina-agarosa y se incuban en un termomezclador (Eppendorf) a 800 rpm durante 5 minutos. La resina se lava una vez con 200 µl de 1X SB 17T + biotina 100 µM y una vez con 200 µl de 1X SB17T.

Etapas 4: Marcaje proteico con biotina

100 µl de NHS-PEO4-biotina 1,2 mM en SB 17T, preparados inmediatamente antes de su uso, se añaden a la resina con aptámero y complejos de aptámero:proteína capturados: y se incuban en un termomezclador a 800 rpm durante 20 minutos. La resina se lavó cinco veces con 200 µl de 1X SB 17T por filtración al vacío.

Etapas 5: Proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotoescisión

El director de goteo se retira desde la parte inferior de la placa Durapore y la placa se coloca sobre una placa de recogida de microtitulación de 1 ml. La resina se lavó una vez con 200 µl de 1X SB 17T por centrifugación a 1000 x g durante 30 segundos. Se añaden 80 µl de 1X SB 17T + $DxSO_4$ 10 mM a la resina y se irradia con una lámpara de mercurio BlackRay en un termomezclador a 800 rpm durante 10 minutos. La placa Durapore se transfiere a una nueva placa Deepwell de 1 ml y se centrifuga a 1000 x g durante 30 segundos para recoger el aptámero fotoescindido y los complejos aptámero:proteína.

Etapa 6: Captura de proteína y eliminación de aptámeros libres

Se añaden 50 ul de esferas paramagnéticas MyOne-estreptavidina C1 (Invitrogen) (10 mg/ml en 1X de SB 17T) a una placa de microtitulación. Las esferas se separan con un imán durante 60 segundos y se retira el sobrenadante. 225 ul de la mezcla de fotoescisión se añaden a las esferas y se mezclan durante 5 minutos. Las esferas se lavaron cuatro veces con 200 ul de 1X SB 17T mediante separación de las esferas magnéticas y sustituyendo el tampón de lavado. Se retira el tampón de lavado final.

Etapa 7: Elución del aptámero

Se añaden 100 ul de tampón de elución fosfato sódico (Na_2HPO_4 10 mM, pH 11) a las esferas y se mezclan durante 5 minutos. 90 ul de eluato se transfieren a una placa de microtitulación y se neutralizan con 10 ul de tampón de neutralización de fosfato sódico (NaH_2PO_4 10 mM, pH 5).

Etapa 8: Hibridación de aptámeros a micromatrices

Las matrices ADN se preparan con sondas de captura de oligonucleótidos compuestas por la secuencia complementaria de la región variable de cada aptámero inmovilizado en un soporte de portaobjetos de microscopio adaptado. Existen múltiples matrices (submatrices) en cada portaobjetos y las submatrices están separadas físicamente por la colocación de una junta (Grace) para la aplicación de la muestra. Las matrices se tratan previamente con 100 ul de tampón de bloqueo y se incuban durante 15 minutos a 65 °C en un termomezclador. 30 ul de tampón de hibridación con concentraciones altas de sal se añaden a 90 ul del aptámero eluido neutralizado en una placa de microtitulación, se incuban a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador y se enfrían a 65 °C a 0,1 °C/segundo. El tampón de bloqueo se retira de las matrices y 110 ul de la muestra de aptámero se añaden a las matrices y se incuban en una cámara húmeda a 65 °C durante 20 horas.

Etapa 9: Lavado de la matriz

La muestra de aptámero se retira de las matrices y las matrices se lavan una vez con 200 ul de tampón de lavado de fosfato de sodio Tween-20 a 65 °C, con la junta en su lugar, y tres veces con 25 ml de tampón de lavado de fosfato de sodio Tween-20 a 65 °C en un frasco pap sin la junta. Las matrices se secan con una pistola de nitrógeno.

Etapa 10: Cuantificar la señal en las matrices

Los portaobjetos con la matriz se escanean en un TECAN LS300 Reloaded en un canal adecuado para la detección de Cy3 y se cuantifica la señal Cy3 en cada función de la matriz.

Resultados:

Los aptámeros específicos de tres dianas diferentes (bFGF, VEGF, y mieloperoxidasa) se produjeron usando los métodos y materiales SELEX tradicionales. Un segundo conjunto de aptámeros específicos para el mismo conjunto de dianas se hicieron usando los nucleótidos en posición 5' modificados y seleccionados para velocidades de disociación muy lentas para sus respectivas dianas. Los aptámeros realizados en el proceso tradicional tenían velocidades de disociación del orden de menos de 5 minutos. Los aptámeros hechos con los nucleótidos modificados y utilizando el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta durante la selección tenían velocidades de disociación superiores a 20 minutos. Se realizaron dos conjuntos de aptámeros para cada diana por los dos métodos diferentes para un total de 4 poblaciones de aptámeros diferentes para cada diana. La capacidad de estas poblaciones de aptámeros para medir las concentraciones de analitos en muestras de ensayo de prueba se evaluó como se describió anteriormente en un intervalo de concentraciones diana. La señal relativa de la detección del chip de ADN se representó frente a la concentración diana de entrada. Véase la Fig. 11A a 11C. La curva de respuesta de los aptámeros tradicionales es muy plana y la sensibilidad de la detección es bastante baja. La sensibilidad de la detección de las dianas respectivas de los aptámeros de velocidad de disociación lenta es excelente. Los datos apoyan la necesidad de utilizar los aptámeros de velocidad de disociación lenta para un máximo rendimiento analítico.

EJEMPLO 8. Generación de aptámeros de BzdU alta afinidad por la trombina humana

A. Preparación de mezcla candidata

Una mezcla candidata que contienen dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP se preparó por extensión de la polimerasa de un cebador con un cromóforo 5'ANA y se purificaron como se describe en el Ejemplo 3.

B. Preparación de la proteína diana

La trombina humana se marcó con biotina como se describe en el Ejemplo 2.

C. Selección del aptámero con el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotorreticulación

La selección del aptámero se realizó como se describe en el Ejemplo 3 con trombina humana biotinilada como la diana.

D. Amplificación y purificación del aptámero

La amplificación y purificación se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

E. Rigurosidad de selección y retroalimentación

La rigurosidad de la selección y la retroalimentación se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

F. Propiedades del aptámero

La constante de unión en equilibrio (Kd) del aptámero 2336-17 de esta selección fue 4.4×10^{-11} M (medido de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1) como se demuestra en la FIG. 15.

Los aptámeros de ADN de cadena sencilla a la trombina humana se seleccionaron de una biblioteca compuesta por los nucleótidos dA, dC, dG, y dT naturales (Bock, et al., 1992). Las afinidades de unión de los aptámeros tenían valores de Kd que van desde 2.5×10^{-8} M a 2.0×10^{-7} M. El uso de un protocolo similar con una biblioteca compuesta por dA, dC, dG, naturales y 5-(1-pentinilo)-dUTP modificado, se seleccionaron los aptámeros con valores de Kd que van desde 4×10^{-7} M a 1×10^{-6} M (Latham, et al., 1994). El Ejemplo 7 describe el descubrimiento de aptámeros de muy alta afinidad por la trombina humana seleccionados de una biblioteca compuesta por dA, dC, dG y BzdU modificado. El aptámero de afinidad más alta de esta biblioteca tenía un valor de Kd de 4.4×10^{-11} M.

Un número de patentes, publicaciones de solicitud de patentes y publicaciones científicas se citan a lo largo y/o aparecen al final de la descripción.

Se pretende que los ejemplos de las publicaciones y las limitaciones relacionadas con las mismas sean ilustrativos y no excluyentes. Otras limitaciones de las publicaciones citadas se harán evidentes para los expertos en la técnica después de una lectura de la memoria descriptiva y un estudio de los dibujos.

Las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" se deben interpretar como inclusivas y no excluyentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Somalogic, Inc.

<120> Método para generar aptámeros con constantes de disociación mejoradas

<130> RIC/FP6616189

<140> EP 08782010.6

<141> 17-07-2008

<150> PCT/US2008/070383

<151> 17-07-2008

<150> US 60/950.283

<151> 17-07-2007

<150> US 60/950.281

<151> 17-07-2007

<150> US 61/031.420

<151> 26-02- 2008

<150> US 61/051.594

<151> 08-05-2008

<150> US 60/950.293

<151> 17-07-2007

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(62)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 1

atatgtcttc ttgtcgtttc gcnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 60

nnggtggagt gtggtgagg 79

<210> 2
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

<400> 2
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

<210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina

<400> 3
 atatttttt ttgtcttctt gtcgttcgc 30

<210> 4
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(61)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <400> 4

atatacgtcc tectctcgt cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 60
ngggacactg ggtgcagg 78

 15 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"
 <400> 5
 25 atatatatcc tgcacccagt gtccc 25
 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina
 40 <400> 6
 atatttttt ttccgtcctc ctctcgtc 29
 <210> 7
 45 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"
 <400> 7
 55 gtcttctgt cgtttcgc 18
 <210> 8
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(59)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 8

atatcccgct cgtcgtctgn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

aggcagacgg tcactc 76

15 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

25 <400> 9
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

30 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

40 <400> 10
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

45 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

55 <400> 11
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

60 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

<400> 12
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

<210> 13

	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"		
	<400> 13		
10	atatatatga gtgaccgtct gcctg	25	
	<210> 14		
	<211> 23		
	<212> ADN		
15	<213> Artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"		
20	<400> 14		
	tttttttcc cgctcgctcg ctg	23	
	<210> 15		
25	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<221> fuente		
	<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"		
	<220>		
35	<221> misc_feature		
	<222> 2, 4		
	<223> t es dT-biotina		
	<400> 15		
40	atatttttt ttccgctcg tcgtctg	27	
	<210> 16		
	<211> 79		
	<212> ADN		
45	<213> Artificial		
	<220>		
	<221> fuente		
	<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"		
50	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> 2, 4		
	<223> t es dT-biotina		
55	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (23)..(62)		
	<223> n es a, c, g o t		
60	<400> 16		
	atatgtgtct gtctgtgtcc tccccccccn nccccccccn nccccccccn nccccccccn	60	
	nnggtggagt gtggtgagg	79	
	<210> 17		

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

10

<400> 17
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

15

<210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

25

<400> 18
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

30

<210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

40

<400> 19
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

45

<210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"

55

<400> 20
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

60

<210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

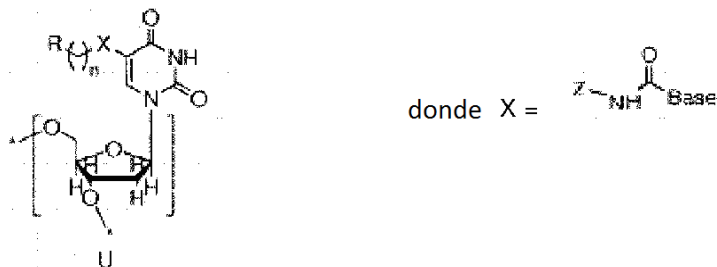
65

<220>
 <221> fuente

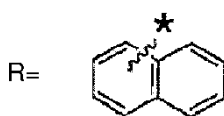
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"
 <400> 22
 tttttttgt gtctgtctgt gtctc 26
 5
 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Sintética"
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina
 20
 <400> 23
 atatttttt ttgtgtctgt ctgtgtcctc 30

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido de uridina de base modificada, teniendo el nucleótido de uridina de base modificada la siguiente estructura:



y Z = R más grupo conector $(CH_2)_n$, donde $n = 1, 2$ o 3 , y



2. El aptámero de la reivindicación 1, en el que $n=1$.

3. El aptámero de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el aptámero comprende al menos dos de dichos nucleótidos de uridina de base modificada.

4. El aptámero de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el aptámero comprende al menos tres de dichos nucleótidos de uridina de base modificada.

5. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el aptámero tiene una velocidad de disociación ($t_{1/2}$) de un complejo de aptámero-diana no covalente superior o igual a aproximadamente 30 minutos.

6. Un complejo no covalente de un aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una molécula diana.

7. Un complejo no covalente de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la velocidad de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la molécula diana es superior o igual a 30 minutos.

8. Un complejo no covalente de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 en el que la molécula diana es una proteína.

9. Un complejo no covalente de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 en el que la molécula diana es una proteína seleccionada de la FIG 7.

10. El aptámero o complejo no covalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la velocidad de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de un complejo de aptámero-diana no covalente está entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 240 minutos; de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos; de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 90 minutos; de aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 120 minutos; de aproximadamente 120 minutos a aproximadamente 150 minutos; de aproximadamente 150 minutos a aproximadamente 180 minutos; de aproximadamente 180 minutos a aproximadamente 210 minutos; o de aproximadamente 210 minutos a aproximadamente 240 minutos.

11. Un kit de diagnóstico que contiene un aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

FIG. 1A

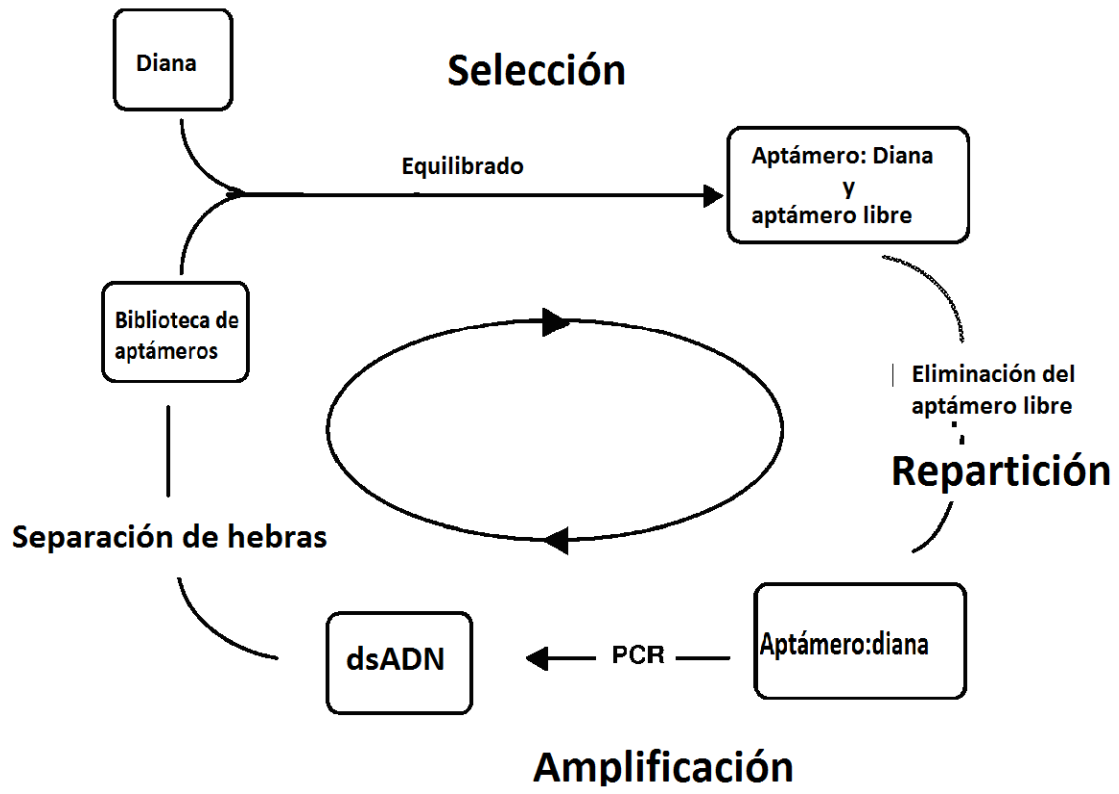
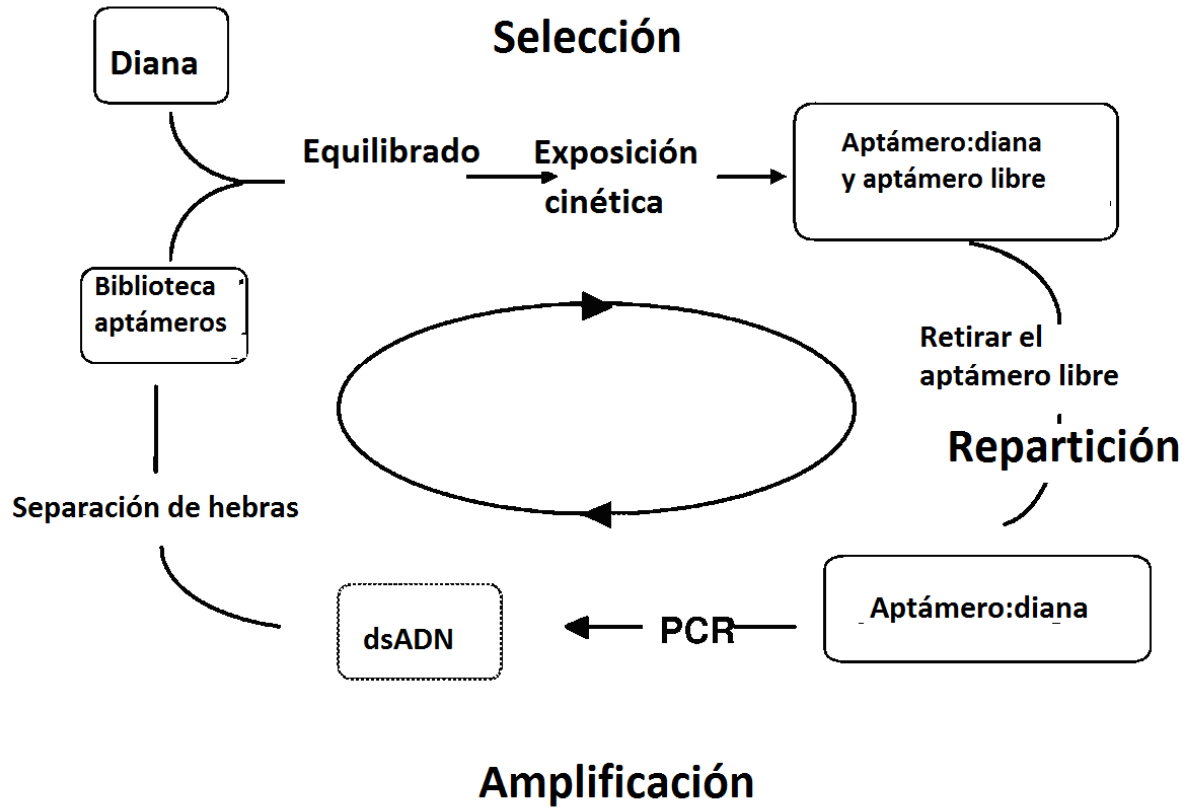


FIG. 1B



Molde 1

5'-ABABGTCTTCTTGTCGTTTCGC-(N)₄₀-GGTGGAGTGTGGTGAGG-3'

(SEC ID Nº :1)

Cebador directo 1 de PCR

5'-ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID Nº : 2)

Cebador inverso 1 de PCR

5'-ABABTTTTTTTTGTCTTCTTGTCGTTTCGC-3' (SEC ID Nº : 3)

Molde 2

5'-ABABCCGTCCTCCTCTCCGTC-(N)₄₀-GGGACACTGGGTGCAGG-3'

(SEC ID Nº :4)

Cebador directo 2 de PCR

5'-ATATATATCCTGCACCCAGTGTCCC-3' (SEC ID Nº : 5)

Cebador inverso 2 de PCR

5'-ABABTTTTTTTTCCGTCCTCCTCTCCGTC-3' (SEC ID Nº : 6)

(His)₆-oligonucleótido complementario

5'-GTCTTCTTGTCGTTTCGC-3' (SEC ID Nº : 7)

FIG. 2

**Sin selección de velocidad de disociación lenta
(n = 65)**

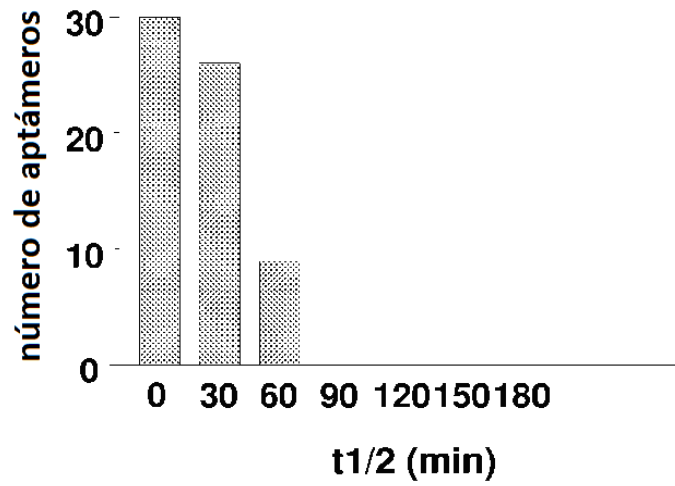


FIG. 3A

**Selección de la velocidad de disociación lenta
(n = 72)**

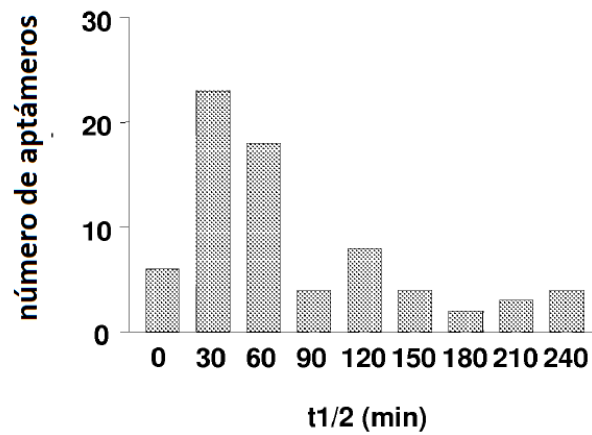


FIG. 3B

Molde 1

5'-ABABCCCGCTCGTCGTCTG-(N)₄₀-CAGGCAGACGGTCACTC-3'

(SEC ID Nº: 8)

Cebador directo BrdU 1

5'-BrdU - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEC ID Nº: 9)

Cebador directo ANA 1

5'- ANA - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEC ID Nº: 10)

Cebador directo AQ 1

5'- AQ - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEC ID Nº: 11)

Cebador directo Psor 1

5'- Psor - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEC ID Nº: 12)

Cebador directo PCR 1

5'-ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEC ID Nº: 13)

Cebador inverso PCR 1

5'-TTTTTTTTTCCCGCTCGTCGTCTG-3' (SEC ID Nº: 14)

Cebador inverso PCR 1

5'-ABABTTTTTTTTTCCCGCTCGTCGTCTG-3' (SEC ID Nº: 15)

FIG. 4A

Molde 2

5'-ABABGTGTCTGTCTGTGTCCTC-(N)₄₀-GGTGGAGTGTGGTGAGG-3'

(SEC ID Nº: 16)

Cebador directo BrdU 2

5'- BrdU - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID Nº: 17)

Cebador directo ANA 2

5'- ANA - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID Nº: 18)

Cebador directo AQ 2

5'- AQ - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID Nº: 19)

Cebador directo Psor 2

5'- Psor - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID Nº: :20)

Cebador directo PCR 2

5'-ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID Nº: 21)

Cebador inverso 2

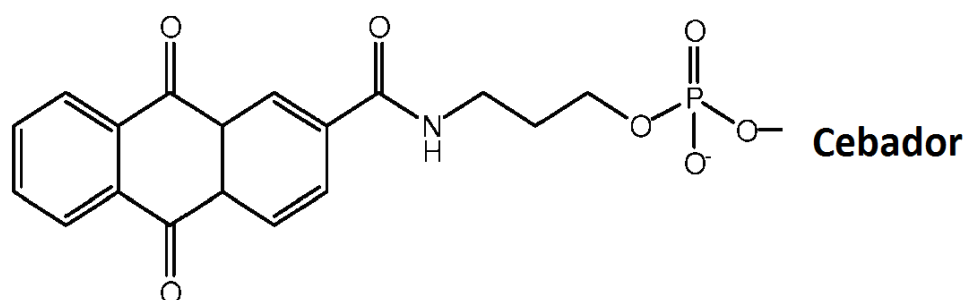
5'-TTTTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEC ID Nº: 22)

Cebador inverso PCR 2

5'- ABABTTTTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEC ID Nº: 23)

FIG. 4B

Antraquinona (AQ)



Psoraleno (Psor)

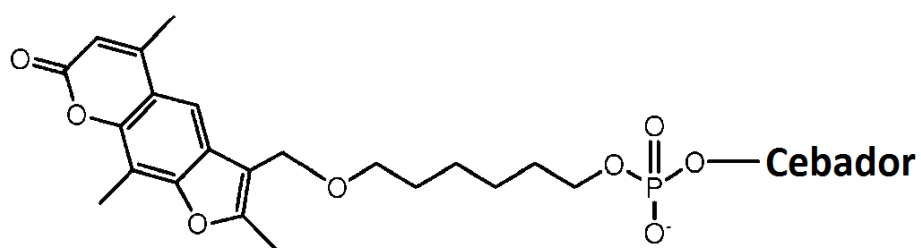
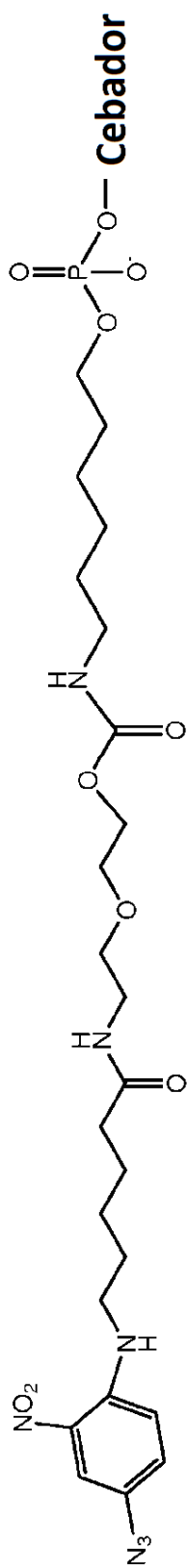


FIG. 5

FIG. 5 Cont.

4-azido-2-nitro-anilina (ANA)



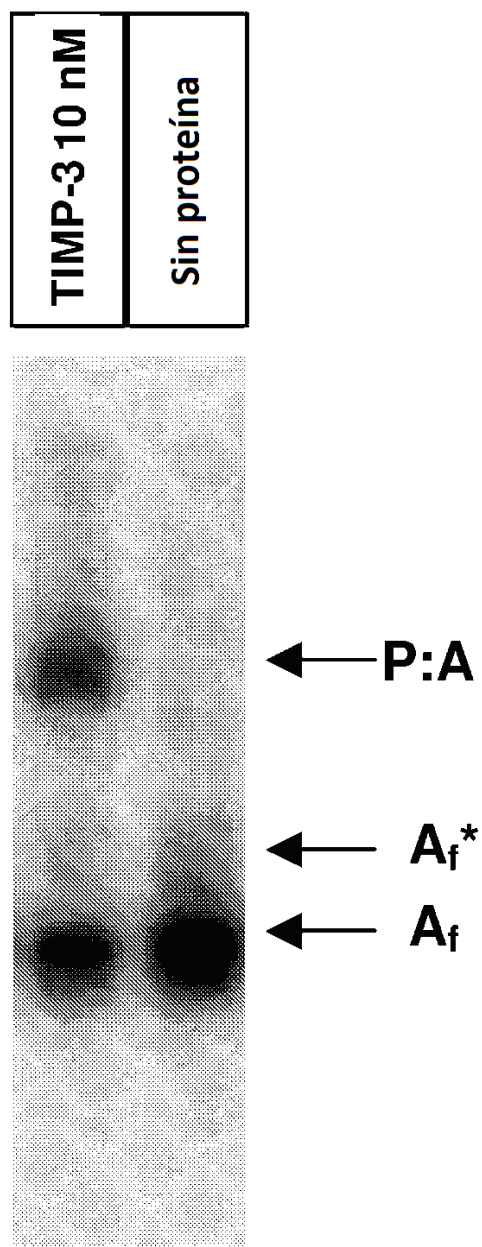


FIG. 6

FIG. 7

4-1BB	C4	Citocromo c	GAS1
Ligando de 4-1BB	C4b	DAN	GASP-2
6CKine	C5	DARPP-32	G-CSF-R
Actinomotripsina a-1	C5a	DC-SIGN	GDF-9
Antiplasmina a2	C5b, 6 Complex	DC-SIGNR	GDF-11
ACE2	C6	Dímero D	GDNF
Proteína C activada	C7	Proteína 19B caja DEAD B	GFAP
Activina A	C8	Desmogleína-1	GFRA-1
Activina RIA	C9	DKK1	GFRA-2
Activina RIB	Cadherina E	DLL4	GFRA-3
ADAMTS-4	Cadherina -5	Dopa descarboxilasa	GIB
ADAMTS-5	Calcineurina B a	DRG-1	GIIIE
Agrecan	Calbaína I	DRR1	GlTR
AIF1	Calbastatina	Dik	Receptor de glucocorticoides
ALCAM	Anhidrasa carbónica IV	EDA (A2)	Glutamato carboxipeptidasa
ALK-1	Cardiotrofina-1	EDAR	Glutación-S-transferasa
Fosfatasa alcalina, ósea	Capsasa-3: (pro)	EG-VEGF	Glipican 3
AMPM2	Catalasa	elf-5	gp130, soluble
Proteína precursora del amiloide	Catepsina A	Elastasa	GPC2
Angiogenina	Catepsina B	EMAP-2	GPVI
Angiopoyetina -1	Catepsina D	ENA-78	Granulolisina
Angiopoyetina -2	Catepsina G	Endostatina	Grazima B
Angiopoyetina -4	Catepsina S	Eotaxina	Gro-a
ANGL3	Catepsina V	Eotaxina -2	Gro-g
ANGL4	CCL28	Eotaxina -3	Receptor de la hormona de crecimiento
Apo A-I	CD51	Efrina -A4	GSK-3 beta
Apo B	CD22	Efrina -A5	GV
Apo E	CD23	Efrina -B3	GX
Apo E2	CD30	Célula epitelial quinasa	HAI-1
Apo E3	Ligando de CD30	EPO-R	Haptoglobina de tipo mixto
Apo E4	ANTÍGENO CD36 I	ER	Hat1
APRIL	CD39	ERBB1	HB-EGF
AREG	CD97	ERBB2	HCC-1
ARGH1	CD109	ERBB3	HCC-4
ARSR	Ceruloplasmina I	FRBB4	HDAC8
ARI	CF-C1	ERK-1	Hemopeptidasa
Artemina	Chk1	ESAM	Cofactor II de heparina
ASAH2	CK-b-8-1	Factor B	HGF
ASAH1	CK-BB	Factor D	Histona; H1.2
ATS1	CK-MM	Factor H	HIV-2 Rev
ATS13	Complejo CLF-1/CLC	Factor I	HMG 1
Aurora quinasa A	CMP-Ácido siálico sintetasa	Ligando Fas, soluble	HO-2
Azurocidina	CNTF	Fas, soluble	HPLN1
B7	CNTRF alfa	FCG2A	HPV E7 Tipo 16
B7-2	CNTN2	FCG2B	HPV E7 Tipo 18
BAFF	Factor de coagulación a-XIIa	FCG3B	HSP 60
BCAM	Factor de coagulación IX	FCGR1	HSP 70
b Catenina	Factor de coagulación IXab	Ferritina	HSP 90a
Bcl-2	Factor de coagulación V	FGF-4	HSP 90b
BCMA	Factor de coagulación VII	FGF-5	HTRA2
BDNF	Factor de coagulación X	FGF-6	HVEM
b-endorfina	Factor de coagulación Xa	FGF7	H11RA
bFGF	Factor de coagulación XI	FGF-8B	H12R2
bFGF-R	Factor de coagulación XIIa	FGF9	I-309
BGH3	Factor de coagulación XIII	FGF-10	IC3b
B-Glucosidasa	Colágeno tipo I	FGF-16	ICOS
BGN	COLEC12	FGF-17	IDE
BLC	COMM7	FGF-18	IDS
BMP-7	Contactina-1	FGF-19	IDUA
BMP-14	Contactina-4	FGF-20	IFN-g
BMPER	COX-2	FGFR-2	IFN-g R1
BMPR1A	Cripto	Fibrinógeno	IFN lambda 1
BMPRII	CRIS3	Fibronectina	IFN-lambda 2
b-NGF	CRP	Htt-3	IgE
proteoglicano óseo II	CTACK	Ligando Jlt-3	IGFBP-1
BPI	CTGF	FRactalkina /CX3CL-1	IGFBP-2
C1q	CTLA-4	FSH	IGFBP-3
C1r	CXCL16, soluble	FST	IGFBP-4
C2	Cistatina C	FYN	IGFBP 5
C3	Cistatina M	Proteína GA733-1	IGFBP-6
C3a	CYTD	Galectina -2	IGFBP-7
C3adesArg	CYTF	Galectina -3	IGF-I
C3b	CYTN	Galectina -4	IGF-I sR
C3d	Citocromo c	Galectina -7	Receptor del IGF-II

FIG. 7 cont

IgM	Lisozima	P-Cadherina	SPINT2
IL-1b	LYVE1	PCNA	Espondina-1
IL-1 R AcP	Receptor de manosa de macrófagos	PDGF Rb	sRAGE
IL-1 R4	MAPK14	PDGF-AA	sRANKL
IL-1 sRI	MATN2	PDGF-BB	sTie-1
IL-1F7	MATN3	PD-L2	sTie-2
IL-1Rrp2	MBL	PDPK1	sTREM-1
IL-2	MCP-1	PECAM-1	STX1a
IL-2 sRg	MCP-2	Perlequina	Sulfotransferasa, factor Nod
IL-4	MCP-3	PF-4	suPAR
IL-4 sR	MCP-4	PGRP-S	TACI
IL-6	M-CSF R	PIGR	TARC
IL-6 sRa	MDC	PKB	tau
IL-7	MEK1	PKC-A	TBP
IL-7 R alfa	MEPE	PKC-B-II	TFCK
IL-8	MER	PKC-D	Tenascina
IL-10	Met	PKC-Z	Tenascina -2
IL-10 Rb	METAP1	Plasmina	TF
IL-11	MIA	Plasminógeno	TFPI
IL-12	MICA	PIGF	TGF-b1
IL-12 Rb1	Midquina	Precalicreína	TGF-b2
IL-13	Mit4gd, de ratón	PRL	TGF-b RIII
IL-13 Ra1	MIG	Properdina	Trombina
IL-15 Ra	Miox, de rata	ácido prostático fosfatasa	Globulina de unión a tiroxina
IL-16	MIP-1a	Proteasa nexina I	TIG2
IL-17 sR	MIP-1b	Proteína C	TIMP-1
IL-17B	MIP-3a	Proteína S	TIMP-2
IL-17D	MIP-3b	Protrombina	TIMP-3
IL-17E	MK01	PSA	TNF sR-I
IL-17F	MMP-1	PSA-ACT	TNF sR-II
IL-18 Bpa	MMP-2	P-selectina	TNFSF15
IL-18 Ra	MMP-3	PSMA	TNFSF18
IL-18 Rb	MMP-7	PTHrP	Tom34
IL-19	MMP-8	PTN	Topoisomerasa I
IL-20	MMP-9	PTP-1B	IPA
IL-21 sR	MMP-13	Inhibidor beta de disociación de Rab GDP	Tpo
IL-22	MMP-14	Rac1	TRAIL
IL-27	MMP-17	RAD51	TRAIL R2
Irosina trifosfatasa	MOZ	RANTES	TRAIL R4
IP-10	MP112	RAP	Transferrina
IR	MPIF-1	RELT	TrATPasa
I-TAC	MSP R	Resistina	TrkB
JAM-B	Mieloperoxidasa	RET	TrkC
JAM-C	Cadena ligera 2 reguladora de la miosina	RGMB	Troponina I
Caliceína 4	NADPH-P450 Oxidorreductasa	RGM-C	Troponina T
Caliceína 5	NANOG	S100A4	Tripsina
Caliceína 18	NAP-2	SAP	Tripsina 2
Caliceína 11	NCAM-L1	SARP-2	TSLP
Caliceína 12	NET4	sCD14	TSLP R
Caliceína 13	NEUROREGULINA 1	SCF sR	TSP2
Carioferina -a2	Neurotrofina -3	SCGF-alfa	TSP4
Quinínogeno HMW cadena sencilla	Neurotrofina -5	SCGF-beta	TWEAK
Quinínogeno HMW dos cadenas	NG36	SDF-1a	UBC9
KLH	Nidógeno	SDF-1b	Ubiquitina +1
KREM2	NKG2D	Semaforina 13A	ULBP-1
Ku70	NKp30	sF-Selectina	ULBP-2
Lactoferrina	NKp44	SET9	ULBP-3
LAG-1	Noggin	sFRP-3	uPA
Laminina	Receptor Nogo	sICAM-2	URB
Lallina	NovH	sICAM-3	VCAM-1
LBP	NPS-PLA2	SIGIRR	VEGF
LD78-beta	NRP1	Siglec-6	VEGF sR2
Leptina	OLR1	Siglec-7	VEGF sR3
Lipocalina 2	ON	Siglec-9	VEGF-C
LKHA4	OPG	SLAMF8	VEGF-D
LRIG3	OSM	s Leptina 3	Vitronectina
LRP8	Ligando de OX40	SLPI	vWF
LSAMP	PAFAH subunidad beta	sL-Selectina	Wfkn2
Hormona luteinizante 3	PAI-1	SMAC	WIF-1
LY86	PAPP-A	sn-1,2- Diacilglicerol quinasa	WISP-3
LY9	PARC	SOD	XEDAR
Linfotactina	Proteína pareja A	Soggy-1	Si
Linfotoxina b R	Proteína pareja B	Sonic Hedgehog	

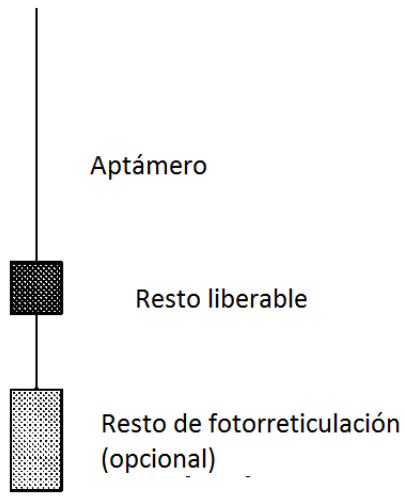


FIG. 8A

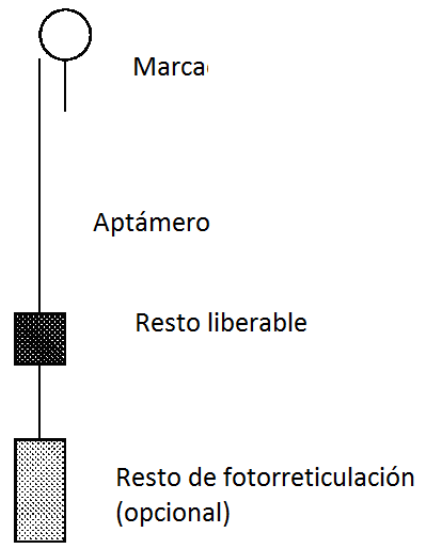


FIG. 8B

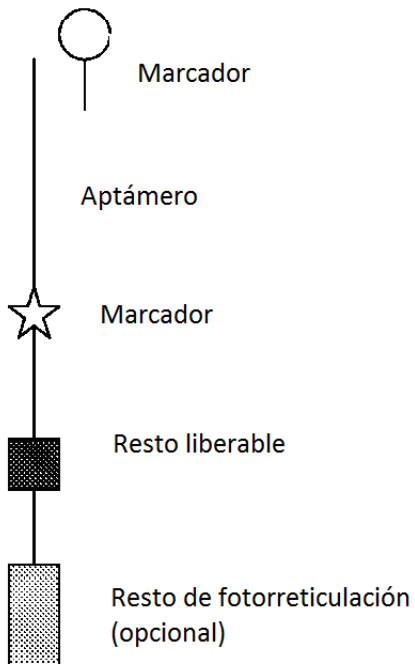


FIG. 8C

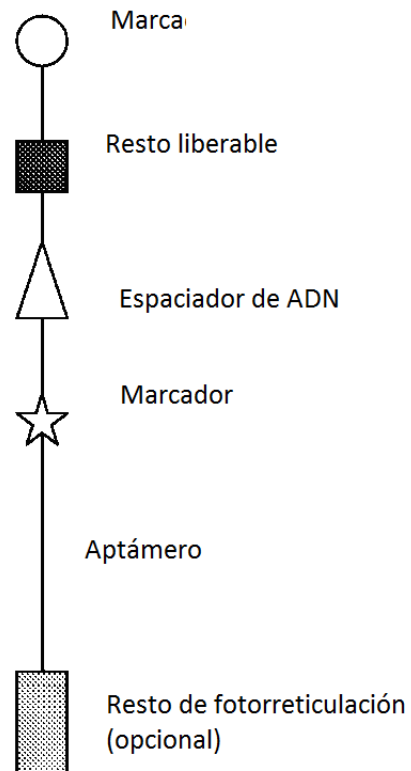


FIG. 8D

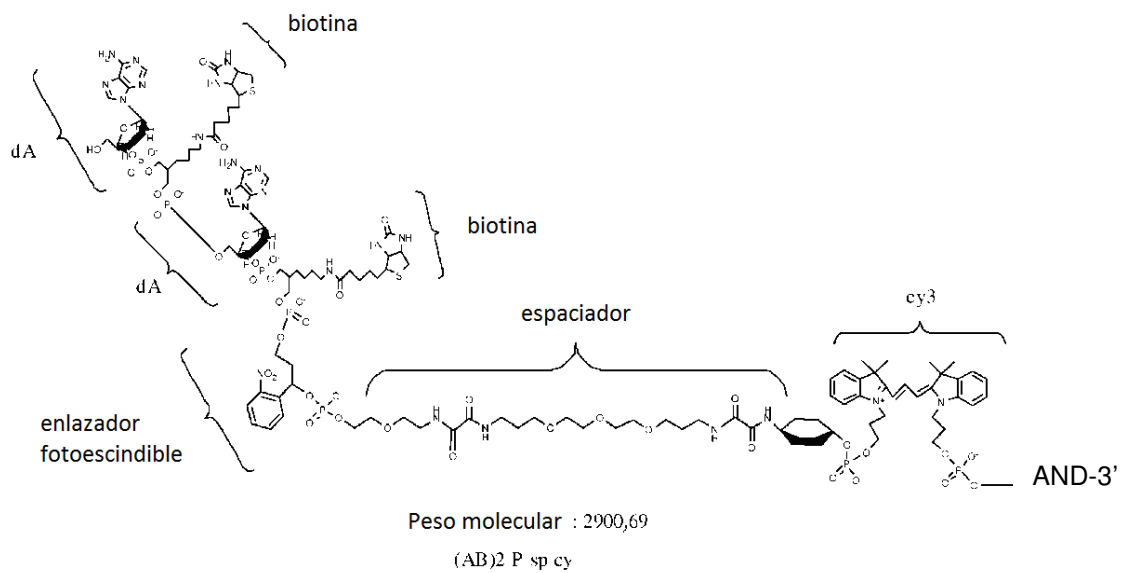


FIG. 9A

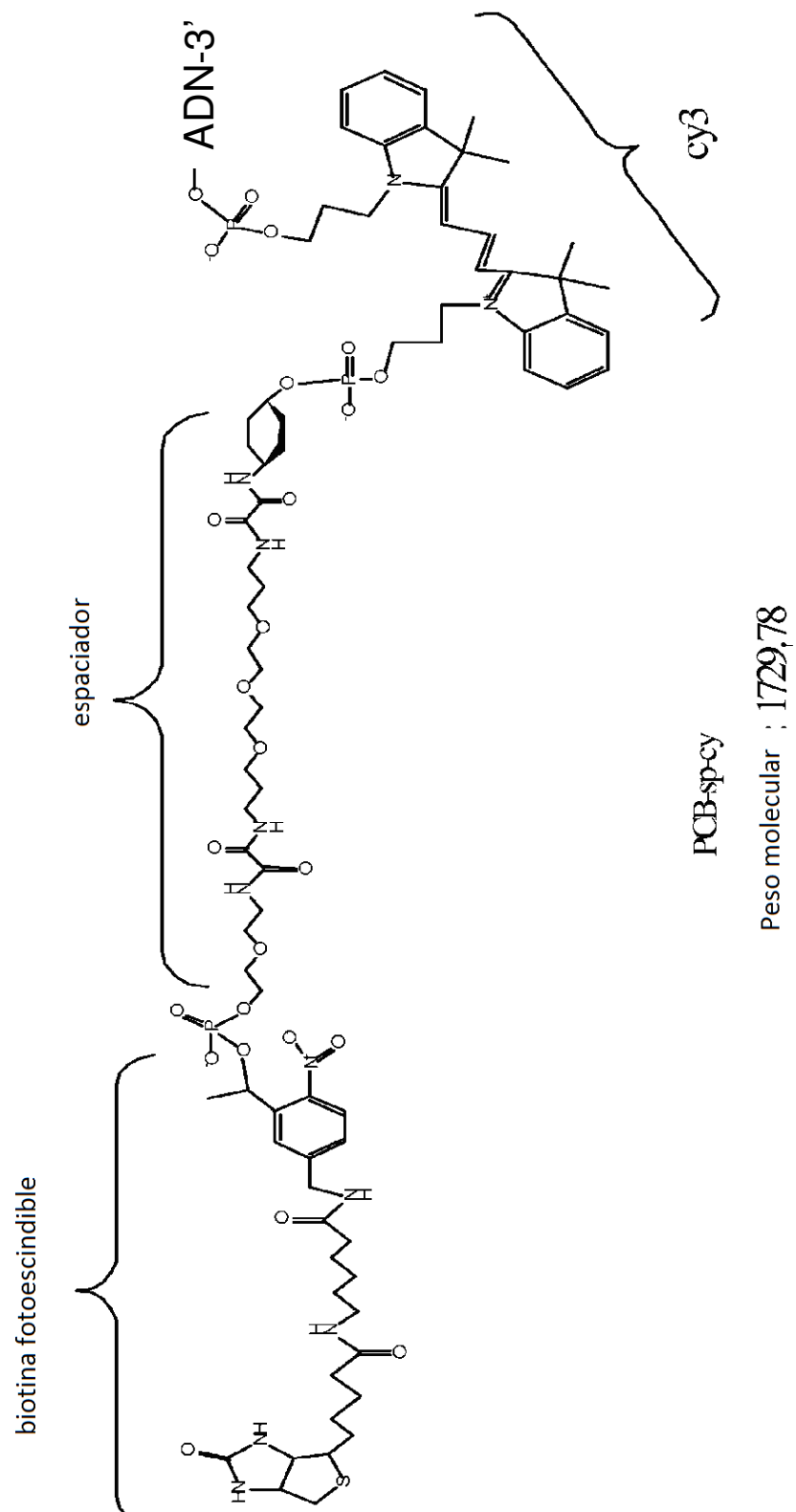


FIG. 9B

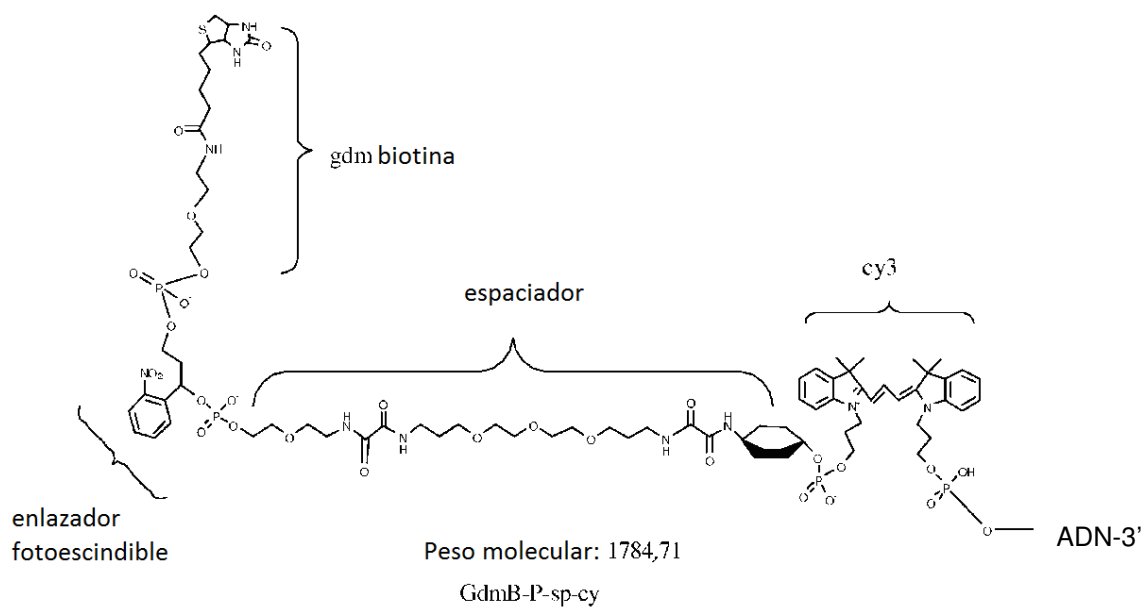


FIG. 9C

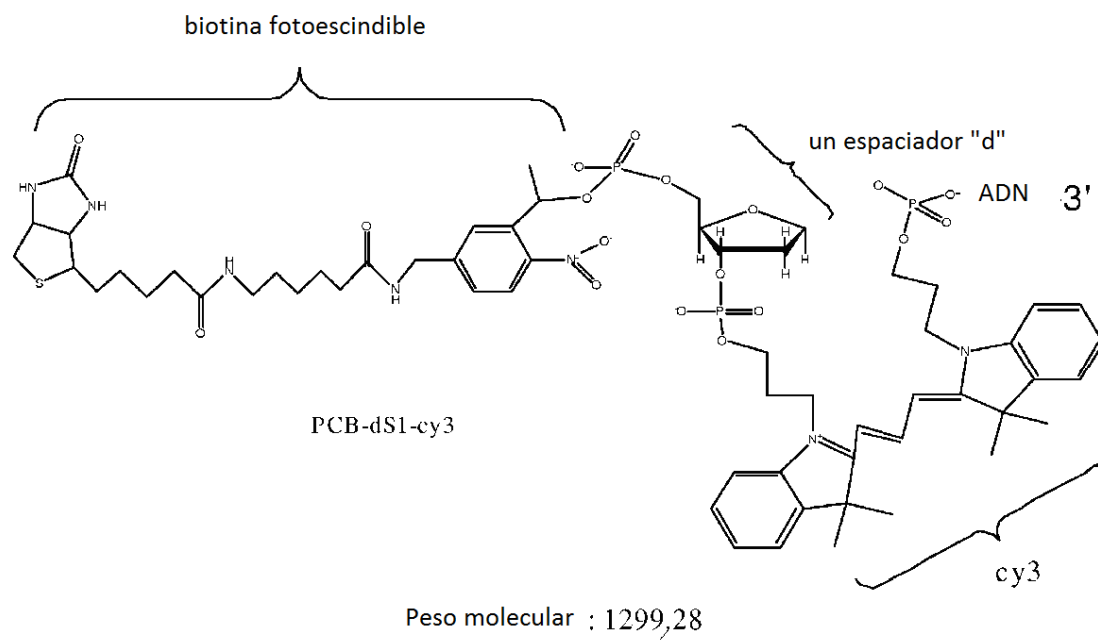


FIG. 9D

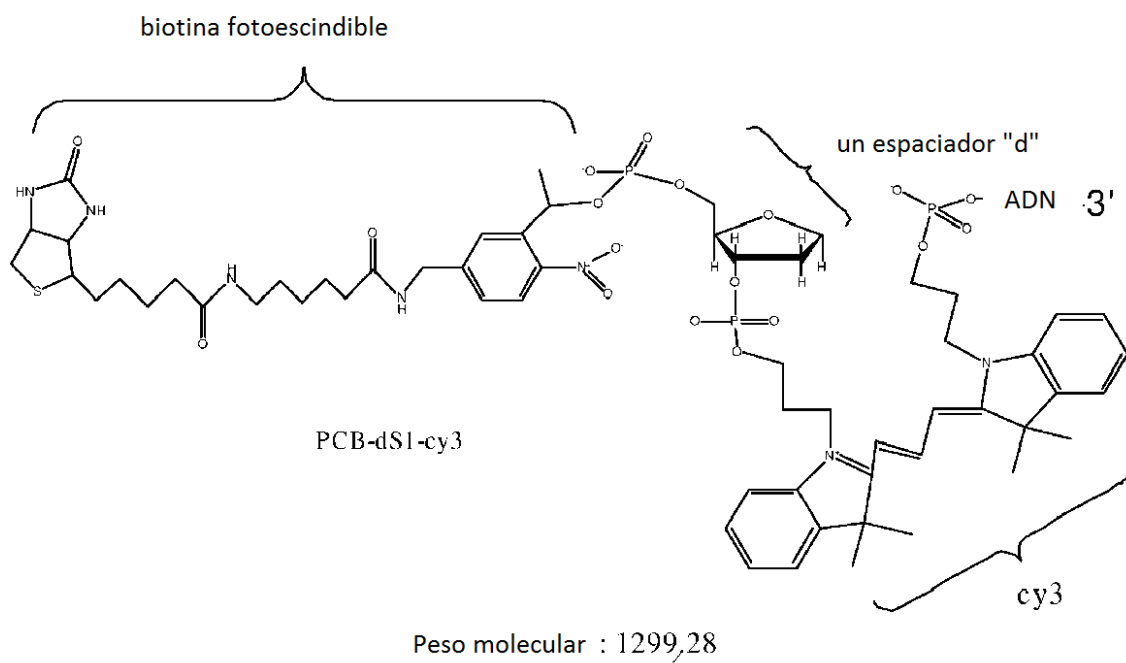


FIG. 9E

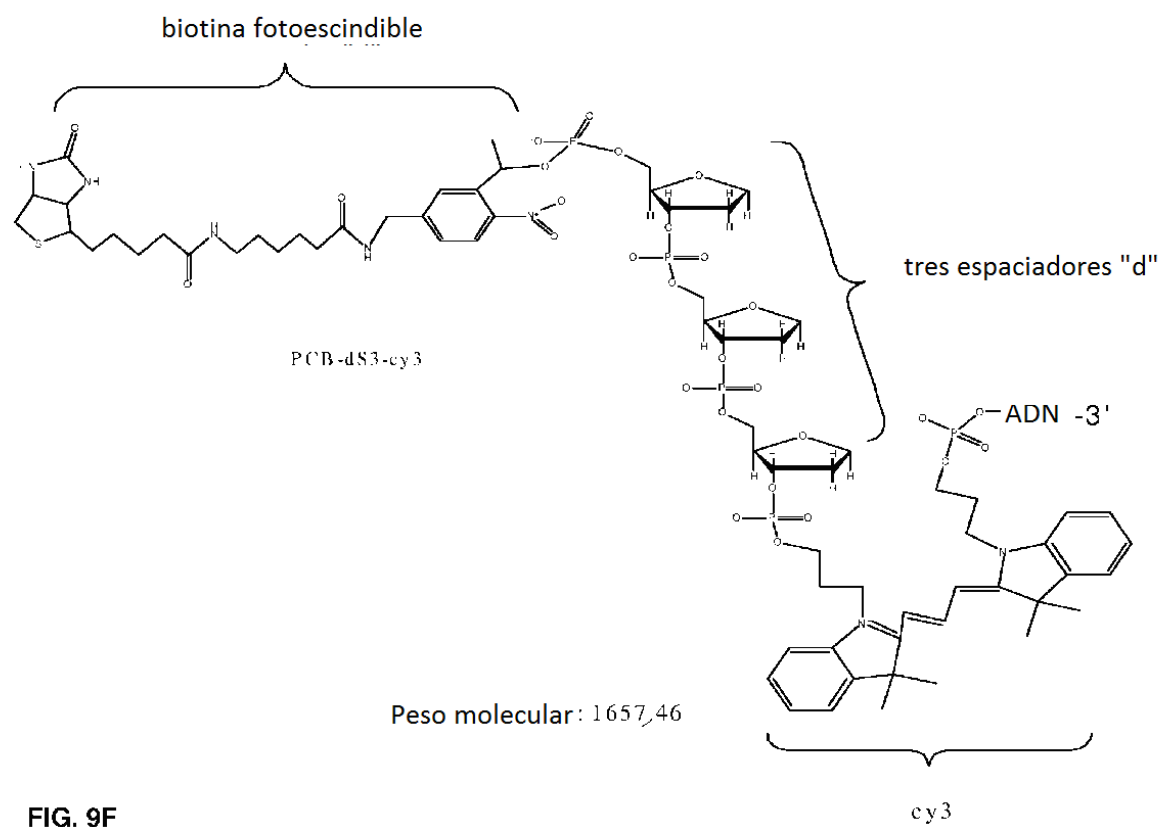


FIG. 9F

FIG. 10

A 5' - CY3 – APTÁMERO – 3'

B 5' - (AB)₂ – (T)₈ – PC - CEBADOR – 3'

C 5' - ANA – PC – CY3 – APTÁMERO – 3'

D 5' - (AB)₂ – (T)₈ – CEBADOR – 3'

FIG. 11A

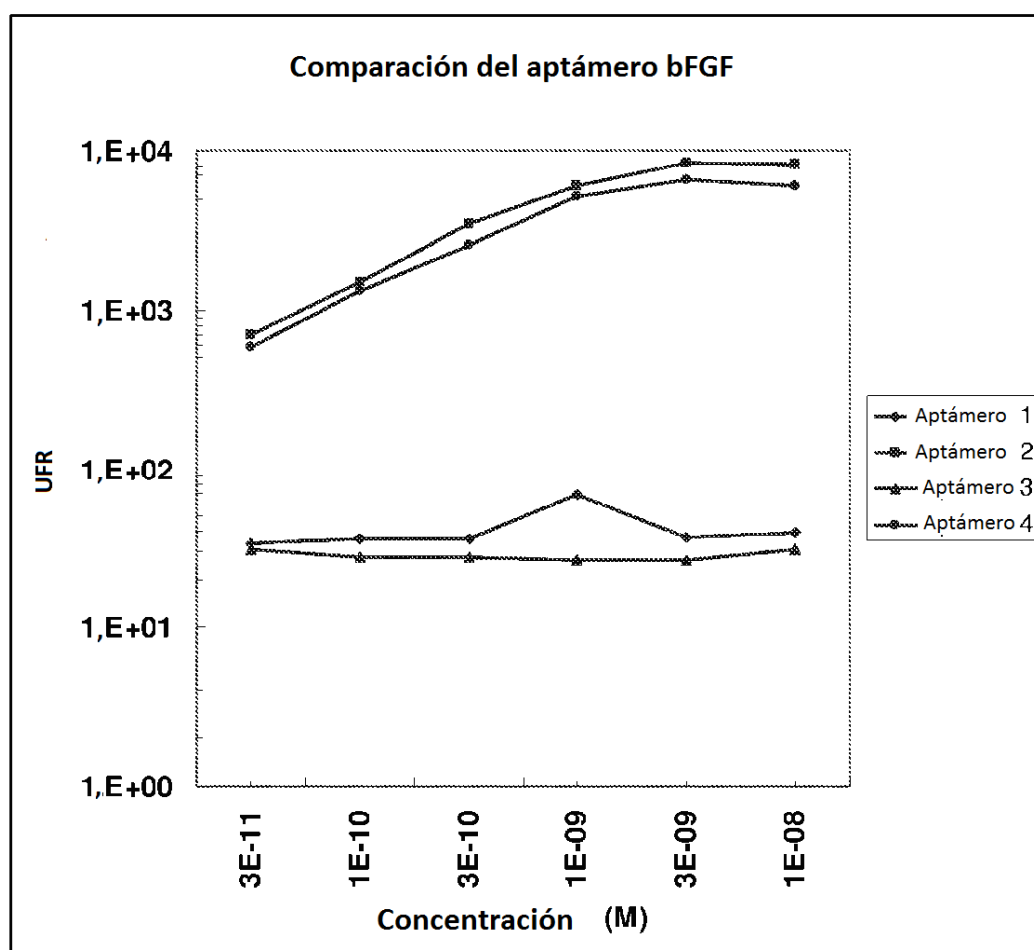


FIG. 11B

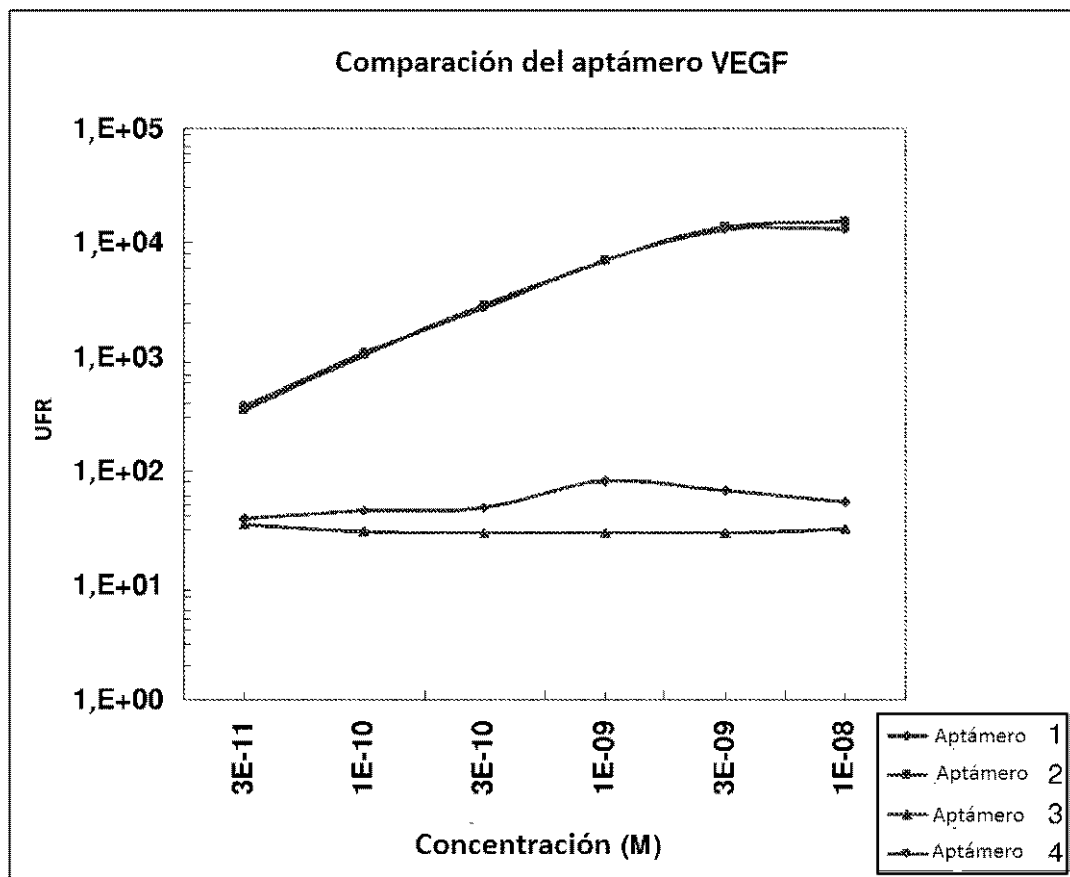


FIG. 11C

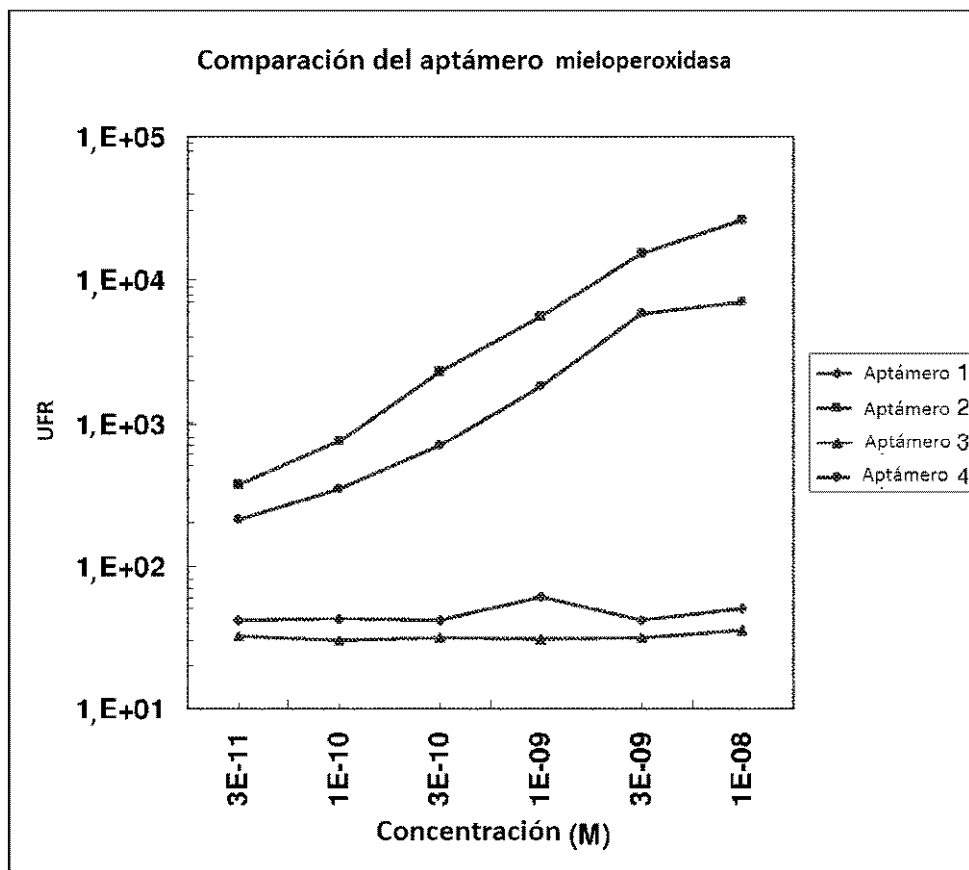


FIG. 12A

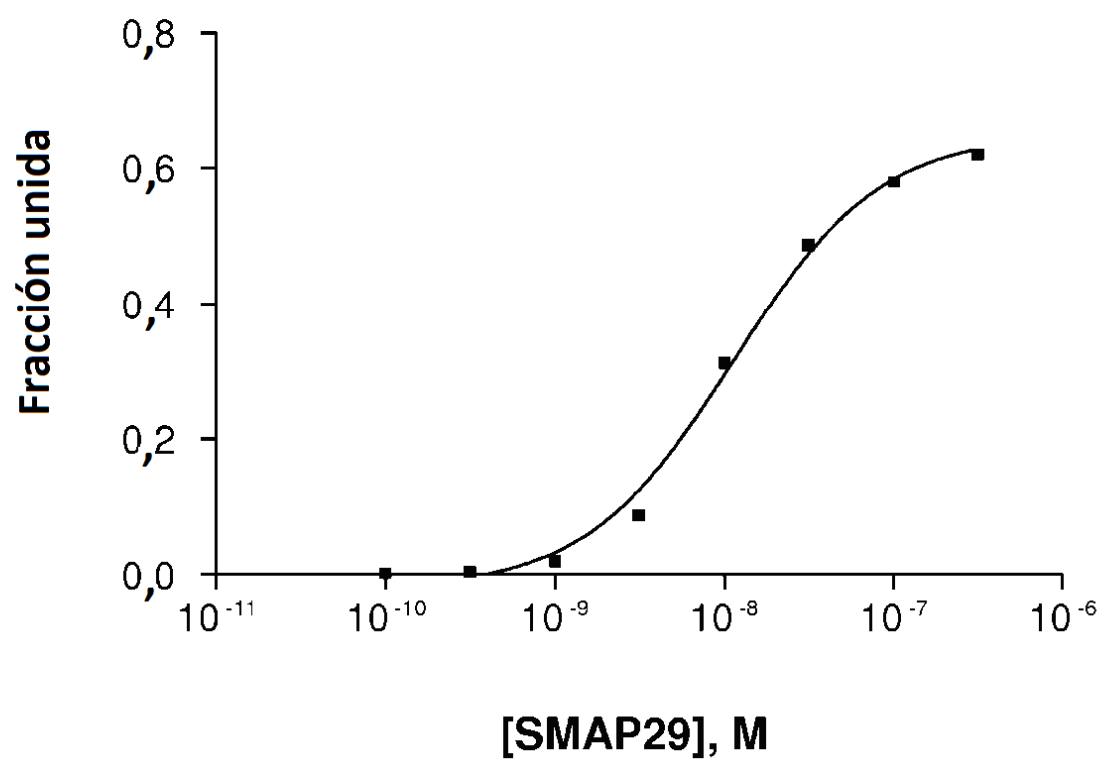


FIG. 12B

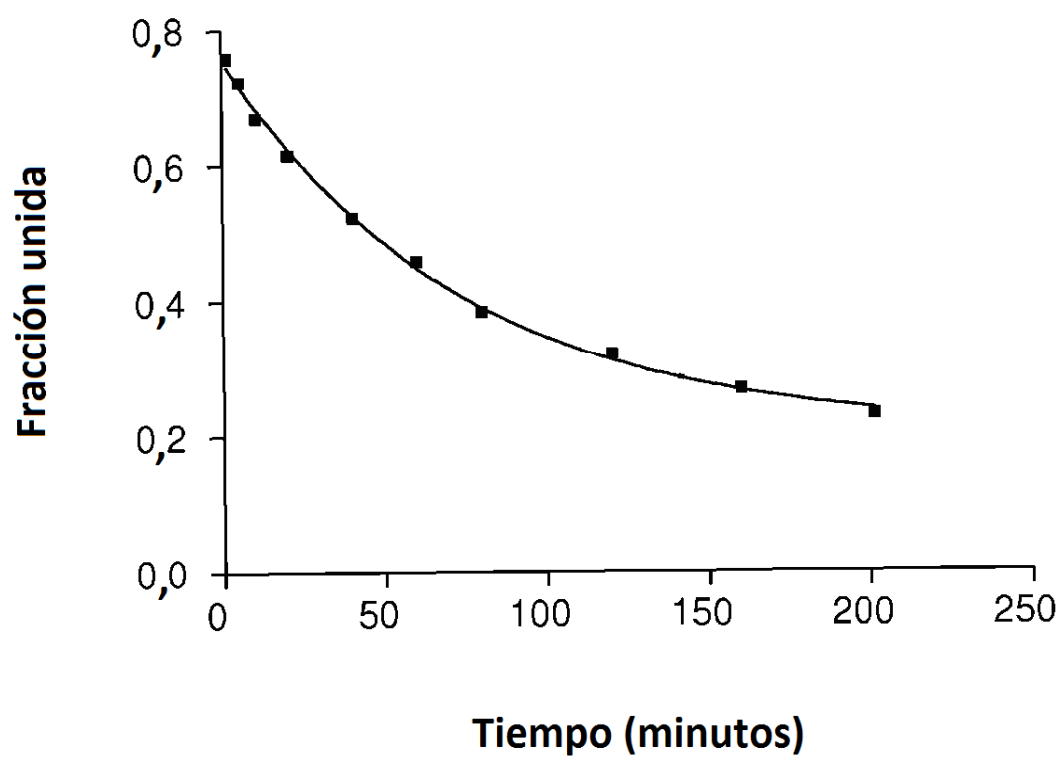


FIG. 13

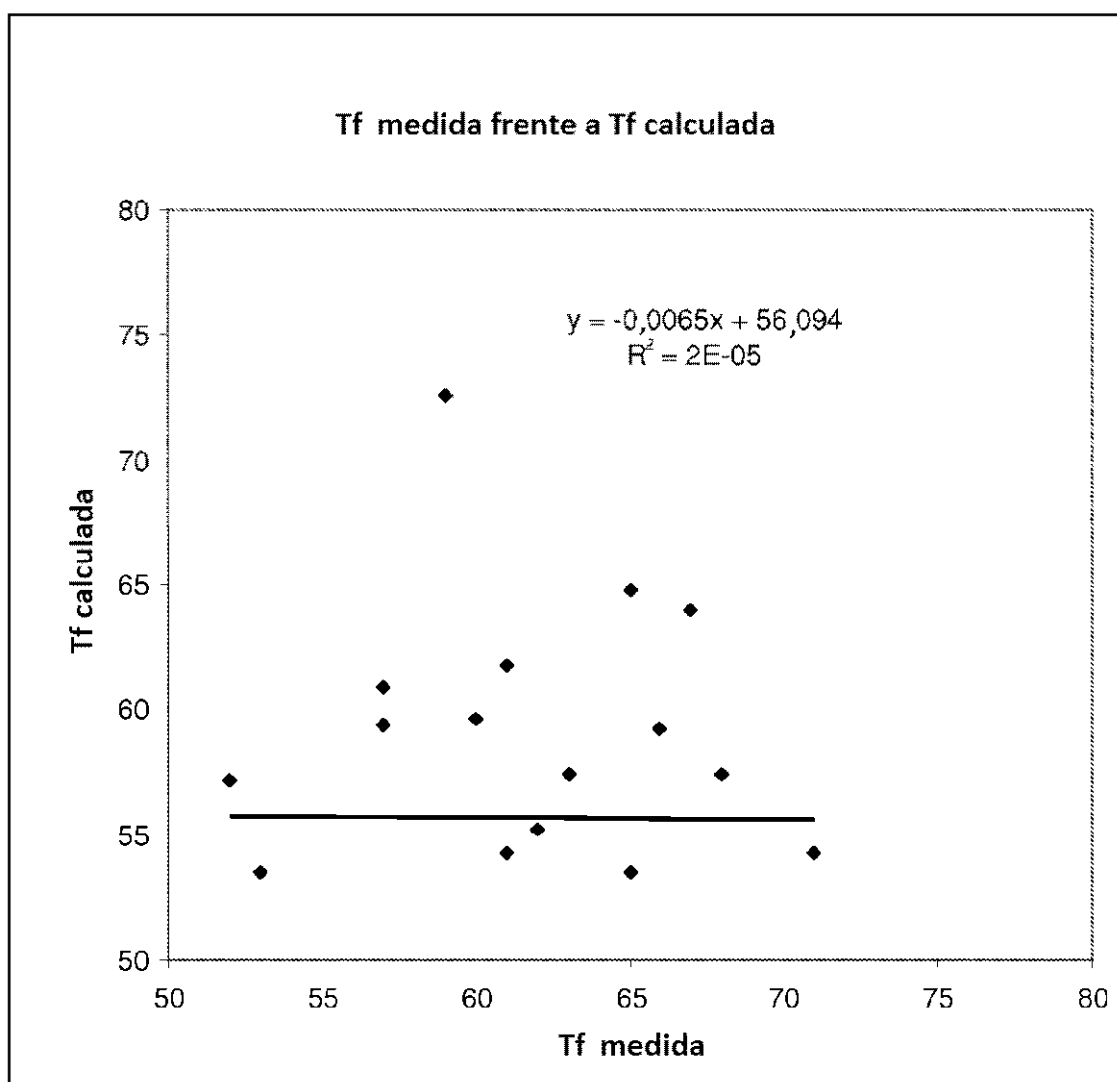
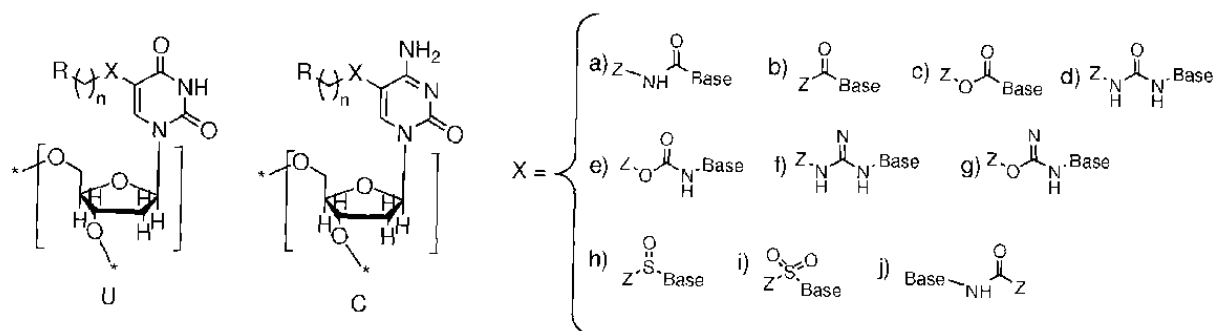


FIG. 14



Base = Uridina (U) o Citidina (C) (la unión es en la posición 5)

Z = R más el grupo conector $(CH_2)_n$, donde $n=0-3$

FIG. 14 Cont

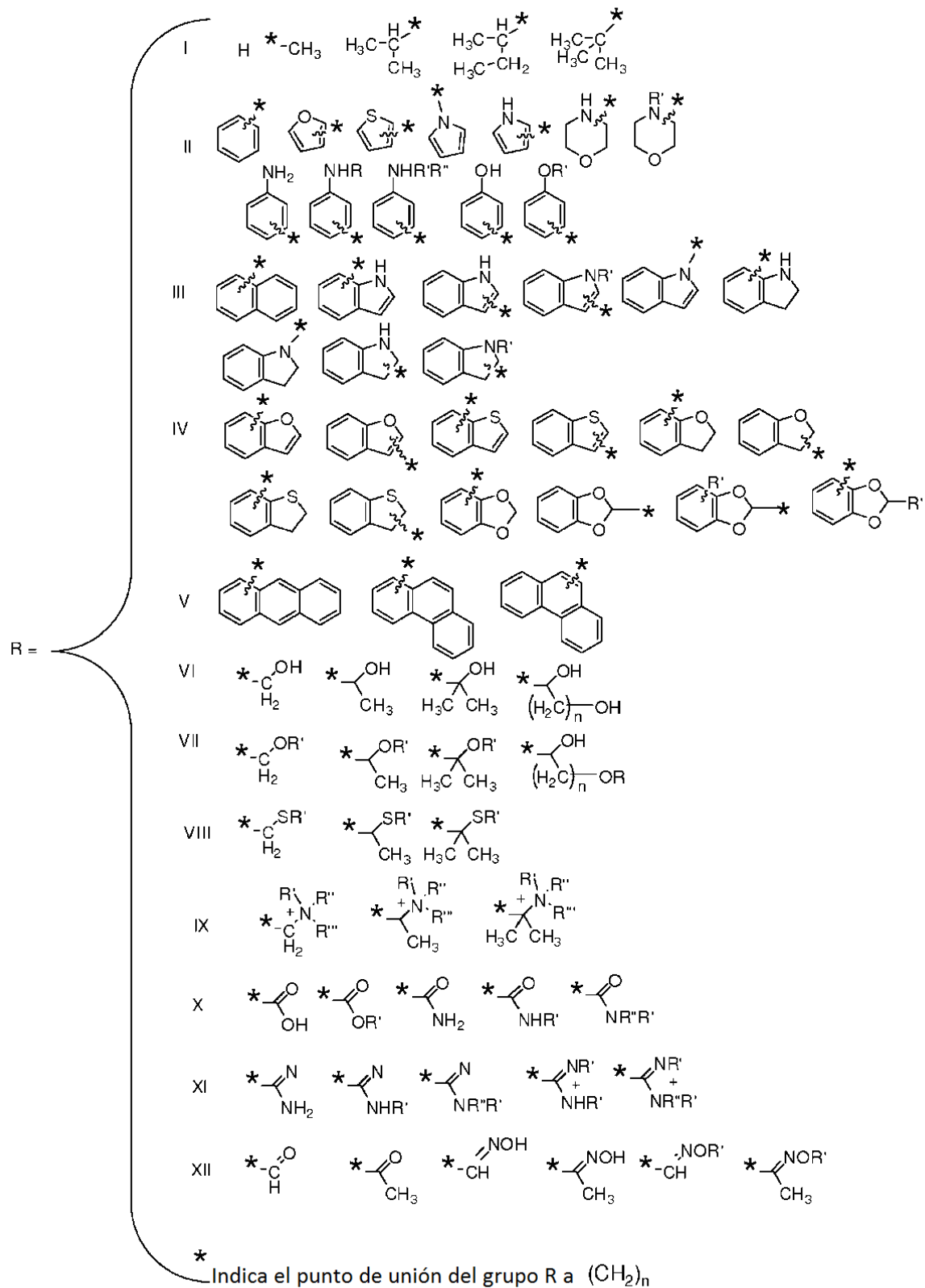


FIG. 15

