

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 633**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2010 PCT/US2010/041540**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11006075**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10797920 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2451981**

54 Título: **Método para generar aptámeros con velocidades de disociación mejoradas**

30 Prioridad:

09.07.2009 US 499967

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

28.04.2017

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;
GOLD, LARRY;
JARVIS, THALE C. y
CARTER, JEFFREY D.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 610 633 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

Método para generar aptámeros con velocidades de disociación mejoradas

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación describe la identificación y el uso de aptámeros de velocidad de disociación lenta que son altamente específicos para una o más dianas histológicas o citológicas de interés. La divulgación describe la composición de estos aptámeros de velocidad de disociación lenta así como métodos para su selección. La divulgación también describe construcciones de aptámeros con funcionalidades mejoradas para métodos de detección. Además, la divulgación describe aplicaciones permitidas por estos aptámeros mejorados tales como métodos para mejorar la identificación de uno o más marcadores específicos en muestras de ensayo histológicas y/o citológicas usando aptámeros específicos de marcador para el diagnóstico de una patología.

15 **Antecedentes**

La siguiente descripción proporciona un resumen de información relevante para la presente divulgación y no es una concesión de que ninguna de la información proporcionada o publicaciones referidas en el presente documento son técnica anterior de la invención reivindicada.

El proceso de SELEX es un método para selección *in vitro* de moléculas de ácido nucleico que son capaces de unirse con alta especificidad con moléculas diana y se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.475.096 titulada "Ligandos de Ácido Nucleico" y Patente de Estados Unidos n.º 5.270.163 (véase también documento WO 91/19813) titulada "Ligandos de Ácido Nucleico". Estas patentes, denominadas colectivamente en el presente documento Patentes de SELEX, describen métodos para preparar un aptámero para cualquier molécula diana deseada.

El proceso de SELEX básico se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.707.796, titulada "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure" describe el uso del proceso de SELEX junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como ADN curvado. La Patente de Estados Unidos n.º 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 diferenciar entre moléculas estrechamente relacionadas, denominado Contra-SELEX. La Patente de Estados Unidos n.º 5.567.588, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX" describe un método basado en SELEX que consigue división altamente eficaz entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana. La Patente de Estados Unidos n.º 5.496.938, titulada "Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev" describe métodos para obtener aptámeros mejorados después de haberse realizado SELEX. La Patente de Estados Unidos n.º 5.705.337, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX" describe métodos para unir colovalentemente un aptámero con su diana. La Patente de Estados Unidos n.º 6.376.424, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Tissue SELEX" describe métodos para producir aptámeros para marcadores específicos de célula o tejido sin la purificación del marcador específico.

El proceso de SELEX abarca la identificación de aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas en el ligando, tales como estabilidad *in vivo* mejorada o características de suministro mejoradas. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de ribosa y/o fosfato y/o base. Se describen aptámeros identificados por proceso de SELEX que contienen nucleótidos modificados en la Patente de Estados Unidos n.º 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides" que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos químicamente modificados en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. La Patente de Estados Unidos n.º 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).

Se describen modificaciones adicionales del proceso de SELEX en la Patente de Estados Unidos n.º 5.763.177, Patente de Estados Unidos n.º 6.001.577 y Patente de Estados Unidos n.º 6.291.184, cada una de las cuales se titula "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX"; véase también, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands". Estas patentes, denominadas colectivamente en el presente documento "Patentes de PhotoSELEX" describen diversos métodos de SELEX para seleccionar aptámeros que contienen grupos funcionales fotorreactivos capaces de unirse y/o fotorreticular con y/o fotoinactivar una molécula diana. Los aptámeros fotorreactivos resultantes se denominan aptámeros de fotorreticulación o fotoaptámeros.

Aunque estos procesos de SELEX y photoSELEX son útiles, siempre existe la necesidad de procesos que conduzcan a propiedades mejoradas de aptámeros generados a partir de técnicas de selección *in vitro*. Por ejemplo, existe la necesidad de aptámeros para moléculas diana con mejores afinidades de unión que los conseguidos con nucleótidos de ADN o ARN de origen natural, así como métodos para producir dichos aptámeros. Para muchas

aplicaciones, tales como por ejemplo, ensayos *in vitro*, diagnóstico, aplicaciones terapéuticas o de captura de imágenes, es de interés producir aptámeros con velocidades de disociación lentas a partir del complejo de afinidad de diana/aptámero. Se han propuesto varias técnicas para producir dichos reactivos (véase, por ejemplo, documentos WO 99/27133 y US 2005/0003362). Sin embargo, estos procesos de selección no diferencian entre la

5 selección de reactivos que tienen cinética de asociación rápida con la diana (es decir, velocidades de asociación rápida) y la selección de reactivos que tienen cinética de disociación lenta con la diana (es decir, velocidades de disociación lentas). Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos procesos y técnicas que favorezcan la selección de aptámeros de velocidad de disociación lenta inhibiendo al mismo tiempo la selección de aptámeros que tienen simplemente una velocidad de asociación rápida con la diana.

10 Shaohua Li *et al* (J. Pathol. (2009) 218: 327-326) presentaron una estrategia de SELEX basada en portaobjetos tisular *in situ* que se dirige a tejidos neoplásicos de pacientes con cáncer de mama. Hicieron evolucionar el aptámero BC15 que puede recomendarse para evaluar el estado de hnRNPA en cánceres.

El documento WO2009/012420 describe métodos, dispositivos, reactivos y kits para la detección de una o más moléculas diana que pueden estar presentes en una muestra.

15 Finalmente, existe la necesidad de construcciones de aptámeros que incluyan diferentes funcionalidades incorporadas. Estas funcionalidades pueden incluir marcadores para inmovilización, marcadores de detección, medios para promover o controlar la separación, etc.

20 La citología consiste en la evaluación de la morfología, la estructura y la subestructura celulares, y como una herramienta de diagnóstico puede aplicarse a cualquier fluido corporal u órgano. Los especímenes pueden ser células liberadas en un fluido tal como orina, fluido gástrico, esputo, pleural, fluido espinal, efusiones, etc. o puede recogerse por biopsia de aguja o aspiración, raspado o cepillado citológico. Puede realizarse biopsia de aspiración en los ganglios linfáticos, tiroides, glándulas salivales, mama, endometrio o próstata. Se usan evaluaciones

25 citológicas para evaluar la patología de orgánulos, muerte celular (necrosis, apoptosis), lesión celular y respuesta, envejecimiento celular, amiloidosis, enfermedades autoinmunitarias y para diferenciar el cáncer de otras patologías.

La histología consiste en la evaluación de la morfología y la estructura tisulares para el diagnóstico de una patología, basándose la identificación de tumor maligno en gran medida en la información histológica. Existen cuatro

30 categorías tisulares principales en el cuerpo -epitelial, conectivo, muscular y nervioso. La visualización microscópica directa de características tisulares es difícil debido al grosor de la muestra tisular. Por lo tanto se han desarrollado técnicas que permiten la producción de secciones finas, representativas, de la muestra tisular para el análisis posterior. La histoquímica es el estudio de la composición química de células y tejidos, normalmente usando reacciones de tinción específicas para identificar y localizar componentes específicos.

35 Se han evaluado muestras tanto de citología como de histología con reactivos inmunológicos. Se han usado anticuerpos para marcadores específicos para introducir colorantes u otros restos de señalización para visualización. Frecuentemente, los métodos inmunológicos son más duros que los métodos convencionales debido al requisito adicional de hacer a la muestra fijada permeable a los reactivos inmunológicos de modo que el método de fijación pueda equilibrarse cuidadosamente con la inmunotinción posterior para evitar la generación de artefactos. El tamaño del anticuerpo limita la difusión a células y tejidos fijados. La parte F_c del anticuerpo puede asociarse de forma no

40 específica con estructuras celulares o tisulares para generar resultados erróneos.

Se está pidiendo en la actualidad a citólogos e histólogos aumentar el número y la variedad de ensayos realizados en un único especímenes recogido. Para conseguir estos objetivos sería ventajoso tener reactivos que pudieran proporcionar una o más de las siguientes características: (1) aplicarse secuencialmente a la misma muestra sin daño significativo a la muestra; (2) premarcarse para reducir o eliminar múltiples etapas de proceso; (3) premarcarse con varios colorantes diferentes o restos detectables que puedan detectarse simultáneamente para detección de múltiples dianas de una única sección; (4) eliminar la necesidad del proceso de recuperación de antígeno como se describe posteriormente; (5) reducir o eliminar el proceso de permeabilización; (6) reducir o eliminar la asociación no específica con la no diana; (7) estabilizar la localización del marcador; y (8) difundir rápidamente a través del tejido para facilitar la tinción de diana rápida. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta podrían abordar cualquiera de estas necesidades además de proporcionar (1) un reactivo más uniforme y fiable debido a que se sintetizan químicamente; (2) reactivos químicamente robustos que tienen requisitos de almacenamiento reducidos; y (3)

55 descubrimiento rápido y de alto rendimiento de reactivos de unión para dirigirse a nuevas proteínas.

Sumario

La presente divulgación describe aptámeros nuevos, y métodos para producir y usar dichos aptámeros. En particular, la divulgación describe aptámeros de velocidad de disociación lenta, aptámeros de velocidad de disociación lenta que contienen pirimidinas C-5 modificadas, y procesos para la selección de aptámeros de velocidad de disociación lenta por dilución, mediante la adición de un competidor, o mediante una combinación de ambos enfoques. Además, se describen aptámeros de velocidad de disociación lenta para diversas 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 refractarios con respecto a la presencia

60
65

de materiales poli-aniónicos y un proceso de selección para estos aptámeros, así como aptámeros construidos con otras diversas funcionalidades para mejorar su utilidad en diversas aplicaciones.

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

En una realización, el método comprende preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; poner en contacto la mezcla candidata con una diana en la que ácidos nucleicos con las mayores afinidades relativas por la diana se unen preferentemente con la diana, formar complejos de ácido nucleico-diana; introducir un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para inducir la disociación de complejos de ácido nucleico-diana con velocidades de disociación relativamente rápidas; dividir los complejos de ácido nucleico-diana unidos restantes de ácidos nucleicos libres en la mezcla candidata; e identificar los ácidos nucleicos que se unieron a la diana. El proceso puede incluir además la etapa por iteraciones de amplificar los ácidos nucleicos que se unen con la diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos con ácidos nucleicos que se unen con la molécula diana pero producen complejos de moléculas de ácido nucleico-diana que tienen velocidades de disociación lentas.

En otra realización, la mezcla candidata de ácidos nucleicos incluye ácidos nucleicos que contienen bases de nucleótidos modificadas que pueden ayudar a la formación de complejos de ácido nucleico-diana modificados que tienen velocidades de disociación lentas. Se desvelan métodos mejorados para realizar SELEX con nucleótidos modificados, incluyendo nucleótidos que contienen grupos fotoactivos u otros funcionales, o nucleótidos que contienen marcadores de posición para grupos fotoactivos en la Solicitud de Estados Unidos n.º de Serie 12/175.388, presentada el 17 de julio de 2008, titulada "Improved SELEX and PHOTOSELEX", publicada como documento US2009/0098549. También pueden usarse nucleótidos marcadores de posición para la introducción durante SELEX o post-SELEX de nucleótidos modificados que no son fotorreactivos.

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

En otro aspecto, los diversos métodos y etapas descritos en el presente documento pueden usarse para generar un aptámero capaz de modificar la bioactividad de una diana mediante la unión y/o reticulación con la diana. En una realización, se identifica un aptámero para una diana única asociada con o relevante para un proceso de enfermedad específico. Este aptámero puede usarse como un reactivo de diagnóstico, bien *in vitro* o bien *in vivo*. En otra realización, puede administrarse un aptámero para una diana asociada con una patología a un individuo y usarse para tratar la enfermedad *in vivo*. Los aptámeros y fotoaptámeros identificados en el presente documento pueden usarse en cualquier técnica de diagnóstico, captura de imágenes, exploración de alto rendimiento o validación de diana o procedimientos o ensayos para los que pueden usarse aptámeros, oligonucleótidos, anticuerpos y ligandos, sin limitación. Por ejemplo, los aptámeros y fotoaptámeros identificados en el presente documento pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos en detalle en la Solicitud de Estados Unidos n.º de Serie 12/175.446, presentada el 17 de julio de 2008, titulada "Multiplexed Analyses of Test Samples", publicada como documento US2009/0042206.

Diversas realizaciones describen la utilidad de aptámeros de velocidad de disociación lenta para la identificación y visualización de dianas específicas en muestras citológicas y/o histológicas y como reactivos de histología/citología. En una realización, se usan uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta en una evaluación citológica o histológica de una muestra celular o tisular para detectar una o más dianas potenciales en dicha muestra celular o tisular. La evaluación citológica o histológica comprende: a) obtener una muestra celular o tisular y dividir dicha muestra en una pluralidad de alícuotas de muestras celulares o preparaciones o cortes de tejido; b) poner en contacto una primera preparación de muestra celular o corte de tejido con una solución que comprende un aptámero de velocidad de disociación lenta para una diana; c) opcionalmente comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con un control negativo preparado haciendo reaccionar una segunda alícuota de muestra celular o corte de tejido con una solución como en la etapa b) que carece de dicho aptámero de velocidad de disociación lenta; y d) detectar dicho aptámero de velocidad de disociación lenta como una indicación de la presencia o ausencia de dicha diana.

En una realización, se seleccionan aptámeros de velocidad de disociación lenta para una o más dianas de una muestra celular o tisular opcionalmente fijada para su uso en esa célula o ese tejido específico en una aplicación de diagnóstico. Por lo tanto, los aptámeros de velocidad de disociación lenta reconocerían específicamente la diana en

la configuración fijada (tanto si es reticulada como modificada de otro modo) y en el ambiente celular/tisular específico para realizar el diagnóstico. Por lo tanto, no se requeriría ningún proceso de recuperación de antígeno.

5 En otra realización, se producen aptámeros de velocidad de disociación lenta con restos fotorreactivos o químicamente reactivos que pueden usarse para reticular el aptámero (o aptámeros) de velocidad de disociación lenta con su (sus) diana (dianas) específica (específicas) dentro de la muestra citológica o histológica. La capacidad de realizar un enlace covalente entre el aptámero de velocidad de disociación lenta y la diana específica puede facilitar la conservación del resto detectable específico de diana a través de las etapas de procesamiento de la muestra requeridas con una preparación histológica o citológica.

10 Otras realizaciones se basan en aptámeros de velocidad de disociación lenta que son sustancialmente más pequeños que los anticuerpos y deberían tener capacidades de dispersión mejoradas en la muestra celular o tisular. Otras realizaciones más se basan en la eliminación de múltiples etapas del proceso que podrían reducir el daño realizado a las muestras celulares y tisulares, y también sustancialmente acelerar el proceso de tinción.

15 Otras realizaciones más implican analizar múltiples dianas, con los aptámeros de velocidad de disociación lenta específicos correspondientes, a partir de un único portaobjetos lo que reduciría los residuos, el tiempo de procesamiento, el tiempo hasta obtener los resultados y conservaría el espécimen original para cualquier necesidad de ensayo o fines de archivo posteriores. En algunas realizaciones, estos múltiples aptámeros de velocidad de disociación lenta se ponen en contacto con su diana correspondiente de una manera secuencial. En otras realizaciones, estos aptámeros de velocidad de disociación lenta múltiples se ponen en contacto con su diana correspondiente de una manera simultánea. En una realización, el o los aptámeros de velocidad de disociación lenta se producen cada uno con un resto detectable diferente.

25 En otra realización, la presencia de una o más dianas identificadas en una muestra histológica o citológica por la detección de un aptámero de velocidad de disociación lenta específico de diana puede usarse para la diferenciación del tipo y origen de un tumor sospechado. Estas dianas pueden incluir marcadores específicos de tumor así como marcadores específicos de tejido, como hormonas o citoqueratinas. En otra realización, la presencia de una o más dianas identificadas en una muestra histológica o citológica mediante detección de un aptámero de velocidad de disociación lenta específico de diana puede usarse para la selección de agentes terapéuticos apropiados y para evaluar el resultado potencial.

30 En una realización, las etapas a) y b) de la evaluación citológica o histológica pueden incluir una o más de las siguientes etapas: recoger una muestra celular o tisular, fijar la muestra celular o tisular, deshidratar, eliminar, inmovilizar la muestra celular o tisular en un portaobjetos de microscopio, permeabilizar la muestra celular o tisular, tratar con respecto a recuperación de antígenos, tñir, destñir, lavar y bloquear. En una realización, la muestra celular se produce a partir de un bloque celular. En una realización, las etapas de fijación y deshidratación para la muestra tisular se reemplazan con una etapa de congelación.

40 En una realización, se ponen en contacto uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta con la muestra histológica o citológica antes de la etapa de tinción. En otra realización, se ponen en contacto uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta que contienen restos/etiquetas detectables tales como fluoróforos o colorantes con la muestra histológica o citológica para tñir la molécula diana.

45 En una realización, el o los aptámeros de velocidad de disociación lenta para uso en la evaluación histológica o citológica se mezclan en una solución tamponada que puede comprender además materiales de bloqueo, competidores, detergentes, estabilizantes, ácido nucleico vehículo, materiales polianiónicos, etc.

50 En otra realización, el o los aptámeros de velocidad de disociación lenta puestos en contacto con la muestra histológica o citológica pueden actuar como la diana de ácido nucleico en un método de amplificación de ácido nucleico. El método de amplificación de ácido nucleico puede incluir PCR, q-beta replicasa, amplificación en círculo rodante, desplazamiento de cadena, amplificación dependiente de helicasa, amplificación isotérmica mediada por bucle, reacción en cadena de la ligasa, y amplificación en círculo rodante asistida por circularización y restricción.

55 Una realización describe un método para el diagnóstico de una patología específica comprendiendo dicho método: a) obtener una muestra tisular o celular y dividir dicha muestra en una pluralidad de cortes de tejido o preparaciones celulares; b) poner en contacto uno de dichos cortes de tejido o preparaciones celulares con una solución que comprende uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta para una o más dianas contenidas dentro de dicha muestra tisular o celular; c) opcionalmente comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con un control negativo preparado poniendo en contacto un segundo corte de tejido o preparación celular con una solución como en la etapa b) que carece de dicho o dichos aptámeros de velocidad de disociación lenta; d) opcionalmente comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con un tercer corte de tejido o preparación celular preparada tiñendo dicha tercera sección celular o preparación celular para el análisis morfológico apropiado para el tipo tisular o celular y la patología; y e) diagnosticar dicha patología.

65 En una realización, el o los aptámeros de velocidad de disociación lenta se producen con un resto detectable y

pueden detectarse directamente después de la reacción con su diana o sus dianas respectivas después de una etapa de lavado opcional para retirar aptámero de velocidad de disociación lenta o aptámeros de velocidad de disociación lenta que no han reaccionado. En otras realizaciones, la interacción del o los aptámeros de velocidad de disociación lenta con la diana o las dianas respectivas se detecta después de haber reaccionado los dos componentes de un elemento para soportar la generación de señal.

En otra realización, los aptámeros de velocidad de disociación lenta se seleccionan, identifican, producen y/o sintetizan usando un espécimen tisular o celular opcionalmente fijado. Antes del proceso de SELEX, el tejido fijado puede tratarse para permeabilizar membranas de muestra por métodos equivalentes a los usados en el proceso de tinción. El método de fijación usado en el proceso de SELEX puede ser igual que el método de fijación usado en una muestra tisular o celular en el procedimiento histológico/citológico real. El requisito es que la diana para la que es específico el aptámero de velocidad de disociación lenta se presente a la biblioteca de aptámeros en el proceso de selección en la configuración fijada que estará presente en la muestra para analizar.

En otra realización, las dianas detectadas en la muestra histológica o citológica por la presencia de su aptámero de velocidad de disociación lenta afín pueden usarse para guiar el diseño del régimen terapéutico o para predecir la respuesta potencial al régimen terapéutico disponible.

En una realización, pueden prepararse kits para diversas aplicaciones histoquímicas y citológicas usando reactivos de aptámero basándose en los métodos desvelados en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 ilustra varias tinciones diferentes para portaobjetos histológicos, el material que se tiñe y el color esperado del material teñido.

La FIG. 2 ilustra un método de SELEX a modo de ejemplo que incluye la etapa de incorporar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta.

La FIG. 3 ilustra secuencias oligonucleotídicas de molde, cebador y complementarias de aptámero representativas usadas en la divulgación. Los oligonucleótidos se prepararon por técnicas de síntesis en fase sólida convencionales. B=dT-biotina.

La FIG. 4 ilustra histogramas de constantes de velocidad de disociación para aptámeros de afinidad seleccionados sin (FIG. 4A) y con (FIG. 4B) un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta como se describe en el Ejemplo 2.

Las FIGS. 5A y 5B muestran oligonucleótidos que se usaron para preparar las mezclas candidatas o realizar diversas etapas en el proceso de selección descrito en el Ejemplo 2. Los oligonucleótidos se prepararon por técnicas de síntesis de fase sólida convencionales. Se obtuvieron cromóforos BrdU (5-bromo-dUTP), antraquinona (AQ) y psoraleno (Psor) como fosforamiditas y se añadieron al extremo 5' del cebador directo durante la síntesis. Se preparó 4-azido-2-nitroanilina (ANA) como un derivado de para-nitro-fenil carbonato y se acopló a una 5' hexilamina fosforamidita después de la síntesis. Se usaron dos secuencias de mezclas candidatas en este ejemplo, designadas 1 y 2. B = dT-biotina. Se usó Molde 1 (FIG. 5A) solamente con mezclas candidatas que contenían 5'- BrdU, AQ, y ANA y se usó Molde 2 (FIG. 5B) solamente con mezclas candidatas que contenían 5'-Psor para el Ejemplo 2.

La FIG. 6 ilustra las estructuras químicas de los cromóforos acoplados al extremo 5' terminal del cebador directo como se ilustra en las FIGS. 5A y 5B.

La FIG. 7 ilustra un análisis de PAGE de actividad de reticulación de biblioteca enriquecida con TIMP-3 5'ANA/BndU usando photoSELEX 5' fijado como se describe en el Ejemplo 3. El gel ilustra la separación de aptámero libre (A_i), aptámero reticulado intramolecular (A_i^{*}) y complejos de proteína: aptámero reticulados (P:A).

La FIG. 8 es un diagrama de más de 500 dianas para las que se han identificado aptámeros. Muchos de estos aptámeros se han diseñado para tener velocidades de disociación lentas de sus dianas respectivas.

Las FIGS. 9A a 9D ilustran construcciones de aptámeros que contienen diversas funcionalidades diferentes y opcionales incluyendo marcadores de inmovilización, etiquetas, restos fotorreticulantes, espaciadores y restos liberables.

Las FIGS. 10A a 10F ilustran ejemplos de construcciones de aptámeros que incluyen un elemento escindible o liberable, un marcador (por ejemplo biotina), un espaciador y una etiqueta (por ejemplo Cy3).

La FIG. 11 ilustra las construcciones de aptámeros y cebadores descritas en la divulgación. Cy3 representa un colorante Cianina 3, PC un enlazador fotoescindible, ANA un grupo de reticulación fotorreactivo, (AB)₂ un par de restos de biotina separados por restos dA, y (T)₈ un enlazador poli dT. Las construcciones de cebadores son complementarias de la región 3' fijada completa de las construcciones de aptámeros.

Las FIGS. 12A a 12C ilustran curvas de respuesta a dosis para aptámeros de velocidad de disociación lenta frente a aptámeros tradicionales para tres dianas diferentes.

Las FIGS. 13A y 13B ilustran curvas de rendimiento para un aptámero de velocidad de disociación lenta donde la diana era un péptido.

La FIG. 14 describe las modificaciones de bases de nucleótidos incluidas en esta divulgación. Se describen los grupos R que pueden usarse además de los enlazadores (X) que pueden usarse entre el punto de unión de nucleótidos y el grupo R. Las posiciones de unión para los diversos grupos "R" también se indican en el grupo R respectivo.

La FIG. 15 ilustra una representación usada en la determinación de la constante de unión para un aptámero de velocidad de disociación lenta que contiene pirimidinas C-5 modificadas con trombina.

La FIG. 16 ilustra una construcción de aptámero que comprende un marcador de 5'-biotina, un espaciador abásico y una etiqueta Cy3. Esta construcción se usó en la síntesis de los aptámeros descritos en los Ejemplos 9-11.

La FIG. 17A ilustra tejido de carcinoma ductal invasivo positivo para HER2 teñido con Cy3-Aptámero de HER2 100 nM + sulfato de dextrano 1 mM. Los núcleos se contratiñen con DAPI. La FIG 17B ilustra desconvolución de canal de Cy3 aumentada de la misma muestra que en la FIG. 17A, que demuestra localización de aptámero membranosa. La FIG. 17C ilustra tumor de mama negativo para HER2 teñido con Cy3- aptámero de HER2 100 nM + sulfato de dextrano 1 mM. Los núcleos se contratiñen con DAPI.

La FIG. 18A ilustra tejido de carcinoma de mama positivo para HER2 teñido con Cy3-aptámero de HER2 en ausencia de competidor. La FIG. 18B ilustra el tejido tumoral como en la FIG. 18A, seguido de un lavado de tampón y 30 minutos de incubación con sulfato de dextrano 1 mM.

Las FIGS. 19A-C ilustran secciones congeladas de carcinoma ductal invasivo HER2 IHC 3+ teñidas con Cy3-aptámero de HER2 en presencia de sulfato de dextrano 1 mM en las siguientes condiciones: [aptámero] = 100 nM en un tiempo de tinción de 1 min (FIG. 19A), 5 min (FIG. 19B) y 30 min (FIG. 19C) y a [aptámero] = 1 μ M en un tiempo de tinción de 1 min (FIG. 19D).

La FIG. 20A ilustra la fluorescencia nuclear a medida que HER2 SOMAmoro se disocia en presencia de sulfato de dextrano 1 mM. Los datos mostrados son la medida +/- DT para n = 5 núcleos, incluyendo el ajuste de curva de regresión no lineal. Se muestra cada quinto tiempo para mayor claridad. La FIG. 20B ilustra fluorescencia membranosa a medida que los SOMAmoros se disocian en presencia de sulfato de dextrano 1 mM y HER2 SOMAmoro no fluorescente 100 nM. Los datos mostrados son la medida +/- DT para n=5 regiones de interés, incluyendo el ajuste de curva de regresión no lineal.

La FIG. 21A ilustra piel normal teñida con Cy3-aptámero de EGFR 3138-49 100 nM + sulfato de dextrano 1 mM; los núcleos se contratiñen con DAPI. La FIG. 21B ilustra piel normal teñida con Cy3-aptámero de EGFR 3159-1 100 nM + sulfato de dextrano 1 mM, los núcleos se contratiñen con DAPI. La FIG. 21C ilustra la tinción de piel normal con aptámero de EGFR 3159-1 biotinilado 100 nM + sulfato de dextrano 1 mM, detectado mediante estreptavidina-peroxidasa de rábano rústico.

La FIG. 22A ilustra inmunofluorescencia de anticuerpo convencional en tejido de próstata humana. La FIG. 22B ilustra tejido de próstata teñido con Qdot605-aptámero de PSA 20 nM + sulfato de dextrano 1 mM, núcleos contrateñidos con DAPI. La FIG. 22C ilustra tinción de aptámero de PSA en tejido de próstata como en la FIG. 22B, aumentada, sin contrateñimiento de DAPI. Las FIGS. 22D ilustran tejido de próstata como en las FIGS. 22B y C con (FIG. 22D) y sin (FIG. 22E) tinción de DAPI.

35 Descripción detallada

La práctica de la invención desvelada en el presente documento emplea, a no ser que se indique de otro modo, métodos convencionales de química, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro del nivel de experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Edición Actual); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & 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); Histology for Pathologists (S.E. Mills, Edición Actual). Todas las publicaciones, documentos de patente publicados y solicitudes de patente citados en la presente memoria descriptiva son indicativos del nivel de experiencia de la técnica a la que pertenece la invención.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" y "el" incluyen referencias plurales, a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa, y se usan indistintamente con "al menos uno" y "uno o más". Por lo 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 modo que la función básica del artículo al que se refiere el valor numérico no cambia.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene" y cualquier variación de las mismas, pretenden abarcar una inclusión no exclusiva, de modo que un proceso, método, producto por proceso o composición de materia que comprenda, incluya o contenga un elemento o lista de elementos no incluye solamente esos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, producto por proceso, o composición de materia.

Como se usa en el presente documento, "ligando de ácido nucleico", "aptámero" y "clon" se usan indistintamente para hacer referencia a un ácido nucleico de origen no natural que tiene o puede tener una acción deseable en una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero sin limitación, unión de la diana, cambio catalítico de la diana, reacción con la diana de una manera que modifica o altera la diana o la actividad funcional de la diana, unión covalente con la diana (como en un inhibidor suicida) y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En una

realización, la acción es afinidad de unión específica por una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional, distinta de un polinucleótido que se une con el aptámero a través de un mecanismo que es predominantemente independiente de la formación de pares de bases de Watson/Crick o unión de triple hélice, en el que el aptámero no es un ácido nucleico que tenga la función fisiológica conocida de unirse con la molécula diana. Los aptámeros incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos, siendo el aptámero un ligando de una diana dada, por el método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana en relación con otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata pueden separarse del resto de la mezcla candidata; (b) separar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada y/o velocidad de disociación lenta del resto de la mezcla candidata; y (c) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada, velocidad de disociación lenta para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, por lo que se identifican aptámeros para la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son un asunto de grado; sin embargo, en este contexto, la "afinidad de unión específica" de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une con su diana generalmente con un grado mucho mayor de afinidad que con el que se une con otros componentes, no diana, en una mezcla o muestra. Un "aptámero" o "ligando de ácido nucleico" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número de nucleótidos adecuado. "Aptámeros" se refiere a más de uno de dicho conjunto de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser monocatenarios, bicatenarios o contener regiones bicatenarias.

Como se usa en el presente documento, "velocidad de disociación lenta" o "velocidad lenta de disociación" o "tasa de disociación lenta" se refieren al tiempo que tarda un complejo de aptámeros/diana en comenzar a disociarse. Esto puede expresarse como una semivida, $t_{1/2}$, o el punto en el que se ha disociado el 50% del complejo de aptámero/diana. La velocidad de disociación de un aptámero de velocidad de disociación lenta, expresada como valores de $t_{1/2}$, puede ser \geq aproximadamente 15 min, \geq aproximadamente 30 min, \geq aproximadamente 60 min, \geq aproximadamente 90 min, \geq aproximadamente 120 min \geq aproximadamente 150 min \geq aproximadamente 180 min \geq aproximadamente 210 min y \geq aproximadamente 240 min.

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 relación de los diversos nucleótidos en la mezcla se optimiza para producir relaciones iguales de cada nucleótido en el producto final. Uno o más de los monómeros en la mezcla pueden comprender un nucleótido modificado. Se usan grupos de protección de amidita en este procedimiento y en una realización, la concentración de monómero es de 0,1 M. Durante la síntesis, se conserva el grupo protector de cinco prima en el ácido nucleico producto. Se realiza la síntesis en un soporte sólido (vidrio de poro controlado, CPG) y se completan al menos aproximadamente 80 ciclos para sintetizar el producto final.

Después del proceso de síntesis, se desprotege el producto de ácido nucleico. Se emplea un tampón de lisina acuosa 1,0 M, pH 9,0, para escindir sitios apurínicos mientras que el producto se retiene en el soporte (vidrio de poro controlado, CPG). Estas secuencias truncadas escindidas se retiran por lavado con agua desionizada (dl) dos veces. Se añaden 500 μ l de agua dl después de los dos lavados en preparación de la etapa de desprotección. La 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 de ácido nucleico se purifica basándose en la hidrofobicidad del grupo protector en una columna PRP-3 HPLC (Hamilton). Se recogen y agrupan fracciones de columna apropiadas, se desalan, y se evaporan hasta su sequedad para retirar los tampones de elución volátiles. El producto final se lava con agua por un proceso de centrifugación y después se resuspende. Finalmente, el material resuspendido se trata para desproteger el producto final. El producto final se caracteriza por composición de base, extensión de cebadores y gel de secuenciación.

Una mezcla candidata de ácidos nucleicos, o una biblioteca de ácidos nucleicos, puede producirse también por 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 de biotina 5'. Todos los procesos sintéticos restantes son como se ha descrito anteriormente. Una vez que se prepara la biblioteca sintética, los ácidos nucleicos pueden usarse en una mezcla de extensión de cebadores que contiene uno o más nucleótidos modificados para producir la mezcla candidata final en un método de extensión de cebadores clásico.

Los aptámeros pueden sintetizarse por la misma química que se usa para la síntesis de una biblioteca. Sin embargo, en lugar de una mezcla de nucleótidos, se introduce un nucleótido en cada etapa en la síntesis para controlar la secuencia final generada por métodos rutinarios. Pueden introducirse nucleótidos modificados en el proceso de síntesis en las posiciones deseadas en la secuencia. Pueden introducirse otras funcionalidades según se desee usando modificaciones químicas conocidas de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, "mezcla candidata" es una mezcla de ácidos nucleicos de diferente secuencia a partir de la que seleccionar un ligando deseado. La fuente de una mezcla candidata puede ser de

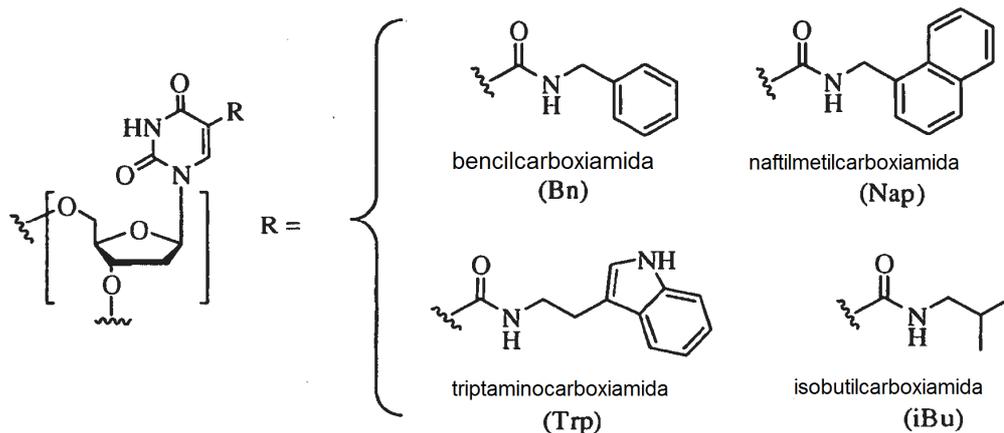
ácidos nucleicos de origen natural o fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente o ácidos nucleicos preparados por una combinación de las técnicas anteriores. Pueden incorporarse nucleótidos modificados, tales como nucleótidos con grupos fotorreactivos u otras modificaciones, en la mezcla candidata. Además, puede usarse un proceso de SELEX para producir una mezcla candidata, es decir, puede usarse un primer experimento de proceso de SELEX para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos que usa como la mezcla candidata en un segundo experimento de proceso de 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 también se denomina en ocasiones "grupo" o "biblioteca". Por ejemplo, un "grupo de ARN" se refiere a una mezcla candidata que comprende ARN.

En diversas realizaciones, cada ácido nucleico en una mezcla candidata puede tener secuencias fijadas en uno de los lados de una región aleatoria, para facilitar el proceso de amplificación. Los ácidos nucleicos en la mezcla candidata de ácidos nucleicos pueden comprender adicionalmente cada uno regiones fijas o secuencias "cola" en sus extremos 5' y 3' para evitar la formación de parásitos de alto peso molecular durante el proceso de amplificación.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan indistintamente 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 químicamente modificados. Las expresiones "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, individualmente o en cualquier combinación, modificaciones de azúcar en la posición 2', modificaciones de pirimidina en la posición 5 (por ejemplo, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propilo]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxamida)-2'-desoxiuridina, o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxiopropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina), modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones de cadena principal, metilaciones, combinaciones de formación de pares de bases inusuales tales como las isobases, isocitidina e isoguanidina, y similares.

En una realización, la expresión "pirimidina C-5 modificada" se refiere a una pirimidina con una modificación en la posición C-5 incluyendo, pero sin limitación, los restos ilustrados en la Figura 14. Los ejemplos de una pirimidina C-5 modificada incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.719.273 y 5.945.527. Los ejemplos de una modificación C-5 incluyen sustitución de desoxiuridina en la posición C-5 con un sustituyente seleccionado de: bencilcarboxiamida (como alternativa bencilaminocarbonilo) (Bn), naftilmetilcarboxiamida (como alternativa naftilmetilaminocarbonilo) (Nap), triptaminocarboxiamida (como alternativa triptaminocarbonilo) (Trp) e isobutilcarboxiamida (como alternativa isobutilaminocarbonilo) (iBu) como se ilustra inmediatamente a continuación.



Como se ha indicado anteriormente, las pirimidinas C-5 modificadas representativas incluyen: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU) y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU).

Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5', tales como recubrimiento terminal o pegilación. Otras modificaciones pueden incluir sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como, por ejemplo, los que tienen enlaces sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y los que tienen enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que

contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes y los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en un azúcar pueden reemplazarse por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse por grupos protectores convencionales; o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH 5' y 3' terminal pueden fosforilarse o sustituirse con aminas, restos de grupos de recubrimiento terminal orgánicos o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o restos de grupo de recubrimiento terminal orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 polímeros de polietilenglicol (PEG) u otros polímeros hidrófilos o hidrófobos biológicos o sintéticos. Si está presente, una modificación de la estructura de nucleótidos puede transmitirse antes o después del ensamblaje de un polímero. Una secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo 2'-O-metil, 2'-O-alil, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Como se ha indicado anteriormente, uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditiato"), (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 (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, como lo pueden ser estructuras de cadena principal alternativas como una cadena principal de poliamida, por ejemplo.

En una realización, la región variable del aptámero incluye nucleótidos que incluyen bases modificadas. Pueden usarse ciertos aptámeros modificados en cualquiera de los métodos, dispositivos y kits descritos. Se ha mostrado que estos nucleótidos modificados producen nuevos aptámeros que tienen velocidades de disociación muy lentas de sus dianas respectivas manteniendo al mismo tiempo alta afinidad con la diana. En una realización, la posición C-5 de las bases de pirimidina puede modificarse. Los aptámeros que contienen nucleótidos con bases modificadas tienen varias propiedades que son diferentes de las propiedades de aptámeros convencionales que incluyen solamente los nucleótidos de origen natural (es decir, nucleótidos no modificados). En una realización, el método para modificación de los nucleótidos incluye el uso de un enlace amida. Sin embargo, pueden usarse otros métodos adecuados para modificación.

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

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente 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 por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ser cadenas individuales o cadenas asociadas. Se usa "marcador" para describir una molécula diana, frecuentemente una proteína, que es un indicador o predictor específico de una enfermedad o afección específica para la que desea un diagnóstico.

Como se usa en el presente documento, "nucleótido fotorreactivo" significa cualquier nucleótido modificado que sea capaz de fotorreticular con una diana, tal como una proteína, tras la irradiación con ciertas longitudes de onda de luz. Por ejemplo, los fotoaptámeros producidos por el proceso de 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-azidofenil)tio]citosina, 5-[(4-azidofenil)tio]uracilo, 7-desaza-7-yodoadenina, 7-desaza-7-yodoguanina, 7-desaza-7-bromoadenina y 7-desaza-7-bromoguanina. Una "pirimidina fotorreactiva" significa cualquiera pirimidina modificada que sea capaz de fotorreticular con una diana tras irradiación de ciertas longitudes de onda. Las pirimidinas fotorreactivas a modo de ejemplo incluyen 5-bromo-uracilo (BrdU), 5-bromo-citosina (BrdC), 5-yodo-uracilo (IdU) y 5-yodo-citosina (IdC). En diversas realizaciones, el grupo funcional fotorreactivo absorberá longitudes de onda de luz que no se absorben por la diana o las partes no modificadas del oligonucleótido.

“SELEX” se refiere a un proceso que combina la selección de ácidos nucleicos que interaccionan con una diana de una manera deseable (por ejemplo, unión a una proteína) con la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. La ciclación por iteraciones 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 grupo que contiene un número muy grande de ácidos nucleicos. La ciclación del procedimiento de selección/amplificación se continúa hasta que se consigue un objetivo seleccionado. La metodología de SELEX se describe en las Patentes de SELEX. En algunas realizaciones del proceso de SELEX, se generan aptámeros que se unen de forma no covalente con sus dianas. En otras realizaciones del proceso de SELEX, se generan aptámeros que se unen covalentemente con sus dianas. En algunas realizaciones las dianas usadas en el proceso de SELEX se fijan de la misma manera en que se fijaría una muestra analítica durante el uso del aptámero de velocidad de disociación lenta en la caracterización histológica o citológica de esta muestra analítica.

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

“Diana de SELEX” o “molécula diana” o “diana” se refiere en el presente documento a cualquier compuesto sobre el que un ácido nucleico puede actuar de una manera deseable. Una molécula diana de SELEX puede ser una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato, un lípido, un polisacárido, una glicoproteína, una hormona, un receptor, un antígeno, un anticuerpo, un virus, un patógeno, una sustancia tóxica, un sustrato, un metabolito, un análogo de estado de transición, un cofactor, un inhibidor, un fármaco, un colorante, un nutriente, un factor de crecimiento, una célula, un tejido, cualquier parte o fragmento de cualquiera de los anteriores, etc., sin limitación. Además la diana puede modificarse de una o más maneras. Por ejemplo, las proteínas pueden modificarse por glucosilación, fosforilación, acetilación, fosfolípidos y así sucesivamente. La diana puede modificarse a niveles diferentes. Podrían producirse aptámeros de velocidad de disociación lenta para diferenciar el tipo o el nivel de modificación. En una realización, una diana de SELEX no incluye moléculas que se sepa que se unan con ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, proteínas de unión a ácido nucleico conocidas (por ejemplo factores de transcripción). Prácticamente cualquier efector químico o biológico puede ser una diana de SELEX adecuada. Las moléculas de cualquier tamaño pueden actuar como dianas de SELEX. Una diana también puede modificarse de ciertas maneras para potenciar la probabilidad o potencia de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana también puede incluir cualquier variación menor de un compuesto o molécula particular, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje, que no altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una “molécula diana” o “diana” es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse con un aptámero. “Moléculas diana” o “dianas” se refieren a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Se describen realizaciones del proceso de SELEX en el que la diana es un péptido en la Patente de Estados Unidos n.º 6.376.190, titulada “Modified SELEX Processes Without Purified Protein”. La Figura 7 enumera más de 500 dianas para las que se han producido aptámeros incluyendo diversos aptámeros de velocidad de disociación lenta. La diana también puede ser un “marcador” o una molécula que sea indicativa de una patología o afección específica y puede usarse en el diagnóstico de esa patología específica o para selección de un régimen terapéutico apropiado o como una indicación de eficacia terapéutica potencial. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen antígeno específico de próstata para cáncer de próstata, CMBK para enfermedad cardíaca, CEA, CA125 para cáncer, HPV16 y HPV 18 para cáncer del cuello uterino, etc. Un ejemplo de un marcador que es predictivo de la eficacia terapéutica es HER2.

“Diana tisular” o “tejido” se refiere a un cierto subconjunto de las dianas de SELEX descritas anteriormente. De acuerdo con esta definición, los tejidos son colecciones de macromoléculas en un ambiente heterogéneo. Como se usa en el presente documento, tejido se refiere a un único tipo celular, una colección de tipos celulares, un agregado de células o un agregado de macromoléculas. Esto difiere de dianas de SELEX más sencillas que son normalmente moléculas solubles aisladas, tales como proteínas. En la realización, los tejidos son macromoléculas insolubles que son órdenes de magnitud mayores que dianas de SELEX más sencillas. Los tejidos son dianas complejas compuestas de numerosas macromoléculas, teniendo cada macromolécula numerosos epítomos que pueden ser proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., o combinaciones de los mismos. Los tejidos son en general una matriz física de macromoléculas que puede ser fluida o rígida, tanto con respecto a estructura como a composición. La matriz extracelular es un ejemplo de un tejido más rígido, tanto estructural como composicionalmente, mientras que una bicapa de membrana es más fluida en estructura y composición. Los tejidos en general no son solubles y permanecen en fase sólida, y por lo tanto puede conseguirse separación con relativa facilidad. Tejido incluye, pero sin limitación, un agregado de células habitualmente de un tipo particular junto con su sustancia intercelular que forman uno de los materiales estructurales habitualmente usados para indicar la estructura celular general de un órgano dado, por ejemplo, tejido renal, tejido cerebral. Las cuatro clases generales de tejidos son tejido epitelial, tejido conectivo, tejido nervioso y tejido muscular.

Los ejemplos de tejidos que quedan dentro de esta definición incluyen, pero sin limitación, agregados heterogéneos de macromoléculas tales como coágulos de fibrina que son acelulares; agregados homogéneos o heterogéneos de células; estructuras ordenadas superiores 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 subestructural, por ejemplo, membranas celulares, núcleos celulares, orgánulos celulares, etc.

Pueden obtenerse fuentes del tejido, estructuras celulares o subcelulares de procariontas así como de eucariotas. Esto incluye estructuras humanas, animales, vegetales, bacterianas, fúngicas y virales.

Cuando se usa un proceso de SELEX tisular para identificar aptámeros de velocidad de disociación lenta específicos de diana a partir de una muestra tisular/celular tomada de un paciente con una enfermedad conocida, este puede ser valioso para realizar una contraselección secundaria y opcional. La contraselección proporciona la capacidad de diferenciar entre tipos tisulares estrechamente relacionados pero diferentes. En este procedimiento los aptámeros de velocidad de disociación lenta originalmente seleccionados se incubarán con una muestra tisular de un donante normal, o no enfermo. Cualquier aptámero de velocidad de disociación lenta en esta mezcla de candidatos preexplorada que reaccionó con el tejido normal se eliminará de la selección posterior. Esta etapa adicional aseguraría que el aptámero de velocidad de disociación lenta seleccionado final fuera altamente específico. La muestra tisular normal y la muestra tisular enferma deberían tratarse de la misma manera (es decir, fijación).

Como se usa en el presente documento, "molécula competidora" y "competidor" se usan indistintamente para hacer referencia a cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con una molécula no diana. En este contexto, las moléculas no diana incluyen aptámeros libres, donde, por ejemplo, un competidor puede usarse para inhibir la unión (reunión) del aptámero, de forma no específica, con 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" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Las moléculas competidoras incluyen, pero sin limitación, oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón, ARNt, sulfato de dextrano, povidextrano, polímeros de fosfodiéster abásicos, dNTP y pirofosfato). En diversas realizaciones, puede usarse una combinación de uno o más competidores.

Como se usa en el presente documento, "complejo no específico" se refiere a una asociación no covalente entre dos o más moléculas distintas de un aptámero y su molécula diana. Un complejo no específico representa una interacción entre clases de moléculas. Los 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" se refiere a un proceso de alteración de las concentraciones relativas de ciertos componentes de una mezcla candidata de modo que la concentración relativa de complejos de afinidad de aptámero que tienen velocidades de disociación lentas aumenta en relación con la concentración de complejos de afinidad de aptámero que tienen velocidades de disociación más rápidas, y 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 modo que ni la diana ni los ácidos nucleicos que forman los complejos de afinidad de aptámero en la mezcla se inmovilizan en un soporte sólido durante el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta. En diversas 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 éstas (por ejemplo, dilución de la mezcla en presencia de una molécula competidora). Debido a que el efecto de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta generalmente depende de las diferentes velocidades de disociación de diferentes complejos de afinidad de aptámero (es decir, complejos de afinidad de 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 conservar una alta proporción de complejos de afinidad de aptámero que tienen velocidades de disociación lentas reduciendo al mismo tiempo sustancialmente el número de complejos de afinidad de aptámero que tienen velocidades de disociación rápidas. El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta puede usarse en uno o más ciclos durante el proceso de SELEX. Cuando se usan dilución y la adición de un competidor en combinación, estos pueden realizarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden. El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta puede usarse cuando la concentración de diana total (proteína) en la mezcla es baja. En una realización, cuando el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta incluye dilución, la mezcla puede diluirse tanto como sea práctico, teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos se recuperan para ciclos posteriores en el proceso de SELEX. En una realización, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta incluye el uso de un competidor así como dilución, que permite que la mezcla se diluya menos de lo que podría ser necesario sin el uso de un competidor.

En una realización, 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)). Se han usado heparina o dextrano en la identificación de aptámeros específicos en selecciones de SELEX anteriores. En dichos métodos, sin embargo, la heparina o 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 heparina o dextrano aumenta, la relación de complejos de diana/aptámero de alta afinidad con respecto a complejos de diana/aptámero de baja afinidad aumenta. Sin embargo, una alta concentración de heparina o dextrano puede reducir el número de complejos de diana/aptámero de alta afinidad en equilibrio debido a competición por la unión a diana entre el ácido nucleico y el competidor. Por el contrario, los métodos descritos en el presente documento añaden el competidor después de haber permitido que se formen los complejos de diana/aptámero y por lo tanto no afectan al número de complejos formado. La adición del competidor después de haberse producido unión en equilibrio entre diana y aptámero crea un estado de desequilibrio que evoluciona en el tiempo hasta un nuevo equilibrio con menos complejos de diana/aptámero. La inmovilización de complejos de diana/aptámero antes de haberse alcanzado el nuevo equilibrio enriquece a la muestra con respecto a aptámeros de velocidad de disociación lenta ya que los complejos de velocidad de disociación rápida se disociarán primero.

En otra realización, se usa un competidor polianiónico (por ejemplo, sulfato de dextrano u otro material polianiónico) en el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para facilitar la identificación de un aptámero que es refractario para la presencia del polianión. En este contexto, "aptámero refractario polianiónico" es un aptámero que es capaz de formar un complejo de aptámero/diana que es menos probable que se disocie en la solución que también contiene el material refractario polianiónico que un complejo de aptámero/diana que incluye un aptámero refractario no polianiónico. De esta manera, pueden usarse aptámeros refractarios polianiónicos en la realización de métodos analíticos para detectar la presencia o 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 es refractario el aptámero.

Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método para producir un aptámero refractario polianiónico. En esta realización, después de poner en contacto una mezcla candidata de ácidos nucleicos con la diana, se permite que la diana y los ácidos nucleicos en la mezcla candidata lleguen al equilibrio. Se introduce un competidor polianiónico y se permite que se incube en la solución durante un periodo de tiempo suficiente para asegurar que la mayoría de los aptámeros de velocidad de disociación rápida en la mezcla candidata se disocian de la molécula diana. Además, se liberarán aptámeros en la mezcla candidata que puede disociarse en presencia del competidor polianiónico de la molécula diana. La mezcla se divide para aislar los aptámeros de alta afinidad, de velocidad de disociación lenta, que han permanecido en asociación con la molécula diana y para retirar cualquier material que no esté en complejo de la solución. El aptámero puede después liberarse de la molécula diana y aislarse. El aptámero aislado también puede amplificarse y pueden aplicarse ciclos de selección adicionales para aumentar el rendimiento general de los aptámeros seleccionados. Este proceso también puede usarse con un tiempo de incubación mínimo si no es necesaria la selección de aptámeros de velocidad de disociación lenta para una aplicación específica.

Por lo tanto, en una realización se proporciona un proceso de SELEX modificado para la identificación o producción de aptámeros que tengan velocidades de disociación lentas (largas) en el que la diana y la mezcla candidata se ponen en contacto y se incuban juntos durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca unión en equilibrio entre la diana y los ácidos nucleicos contenidos en la mezcla candidata. Después de la unión en equilibrio, se añade un exceso de molécula competidora, por ejemplo un competidor polianiónico, a la mezcla 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 menores que 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 debido al exceso de molécula competidora que puede unirse de forma no específica con la diana y ocupar sitios de unión a aptámero en la 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, la separación de 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. Puede usarse una etapa de disociación para disociar los aptámeros de velocidad de disociación lenta de su diana y permite el aislamiento, la identificación, la secuenciación, la síntesis y la amplificación de aptámeros de velocidad de disociación lenta (bien de aptámeros individuales o bien de un grupo de aptámeros de velocidad de disociación lenta) que tienen alta afinidad y especificidad para la molécula diana. Como con SELEX convencional las secuencias de aptámero identificadas de un ciclo del proceso de SELEX modificado pueden usarse en la síntesis de una nueva mezcla candidata de modo que las etapas de puesta en contacto, unión en equilibrio, adición de molécula competidora, incubación con molécula competidora y separación de aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden iterarse/repetirse tantas veces como se desee.

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

Una vez que se selecciona un aptámero de velocidad de disociación lenta específico para la diana deseada este puede producirse sintéticamente o mediante clonación o cualquier otro método para producir la secuencia de ácido nucleico específica.

- 5 Puede introducirse especificidad adicional por el proceso denominado “contra SELEX” que descarta eficazmente ligandos que tienen la capacidad de unirse con la diana así como análogos estructurales estrechamente relacionados de la diana o las dianas dentro de muestras tisulares o celulares normales. En esta realización, se seleccionan aptámeros de velocidad de disociación lenta para un tejido específico y después se realiza una contraselección frente a un tejido relacionado que no tiene ciertas características para las que se desea el aptámero.
- 10 La contraselección puede realizarse frente a una línea celular o tipo celular similar, diferentes células, tejido normal, plasma o sangre, un anticuerpo no específico u otro ligando disponible. Un ejemplo de esta contraselección sería seleccionar en primer lugar usando una diana celular tumoral (tal como un melanoma maligno) y después contraseleccionar los ácidos nucleicos resultantes frente a un tipo celular similar que no es tumorigénico (tal como melanocitos humanos normales). Los aptámeros que interaccionan con tejido tanto normal como neoplásico se retirarán por esta selección negativa y solamente se identificarán (o se conservarán) los aptámeros que se unen específicamente con las células tumorales. El aptámero resultante sería específico para tumores. Esta técnica proporcionará la capacidad de identificar aptámeros que puedan diferenciar entre dos dianas estrechamente relacionadas, es decir, entre una célula cancerosa y una célula no transformada del mismo tipo tisular. La contraselección también puede realizarse *in vivo*. Usando este método se puede no solamente generar aptámeros para dianas específicas en superficies tisulares complejas, sino que también se pueden reconocer las diferencias entre el tejido normal y anómalo de un tipo particular.

Para generar un aptámero de velocidad de disociación lenta para una diana celular o tisular, la muestra celular o tisular se mezcla en primer lugar con una mezcla candidata y se consigue unión en equilibrio. Para conseguir unión en equilibrio, la mezcla candidata se incuba 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. Una vez que se ha conseguido unión en equilibrio puede continuar el proceso de selección.

En una realización, se usa un competidor como un proceso de potenciación de la velocidad de disociación. El periodo de incubación predeterminado de la molécula competidora con la mezcla de la mezcla candidata y diana puede seleccionarse según se desee, teniendo en cuenta factores tales como la naturaleza de la diana y velocidades de disociación conocidas (si las hubiera) de aptámeros conocidos para la diana. Pueden seleccionarse periodos de incubación predeterminados de: al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos 45 minutos aproximadamente, 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 realizaciones, se usa una dilución como un proceso de potenciación de la velocidad de disociación y puede llevarse a cabo incubación de la mezcla candidata diluida, complejo de diana/aptámero, durante un periodo de tiempo predeterminado, que puede seleccionarse de: al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 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 así como usos de cualquier aptámero específico. Estos son aptámeros que tienen una semivida de disociación ($t_{1/2}$) de un complejo de aptámero-diana no covalente que es mayor que la de aptámeros normalmente obtenidos por SELEX convencional. Para una mezcla que contiene complejos no covalentes de aptámero y diana, la $t_{1/2}$ representa el tiempo que tardan la mitad de los aptámeros en disociarse de los complejos de aptámero-diana. La $t_{1/2}$ de aptámeros de velocidad de disociación lenta de acuerdo con la presente divulgación se elige de una de: mayor de o igual a aproximadamente 15 minutos; entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 30 minutos; entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 240 minutos; entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 60 minutos; entre aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 90 minutos, entre aproximadamente 90 minutos y aproximadamente 120 minutos; entre aproximadamente 120 minutos y aproximadamente 150 minutos; entre aproximadamente 150 minutos y aproximadamente 180 minutos; entre aproximadamente 180 minutos y aproximadamente 210 minutos; entre aproximadamente 210 minutos y aproximadamente 240 minutos.

Un elemento característico de un aptámero identificado por un procedimiento de SELEX es su alta afinidad por su diana. Un aptámero tendrá una constante de disociación (K_d) por su diana que se elige de una de: menos de aproximadamente 1 μ M, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de

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

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente de etiquetado”, “etiqueta” o “resto detectable” o “elemento detectable” o “componente detectable” se refiere a uno o más reactivos que pueden usarse para detectar un complejo de molécula/aptámero diana. Un resto o etiqueta detectable puede detectarse directa o indirectamente. En general, cualquier molécula indicadora que sea detectable puede ser una etiqueta. Las etiquetas incluyen, por ejemplo, (i) moléculas indicadoras que pueden detectarse directamente en virtud de la generación de una señal, (ii) miembros de pares de unión específicos que pueden detectarse indirectamente por unión posterior a un afin que contiene una molécula indicadora, (iii) marcadores de masa detectables por espectrometría de masas, (iv) cebadores oligonucleotídicos que pueden proporcionar un molde para amplificación o ligamiento, y (v) una secuencia polinucleotídica específica o secuencia de reconocimiento que puede actuar como un ligando, tal como, por ejemplo, una proteína represora, en la que en los dos últimos casos el cebador oligonucleotídico o proteína represora tendrá, o será capaz 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, colorante, molécula fluorescente, punto cuántico, molécula quimioluminiscente, coenzima, sustrato de enzima, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, secuencia polinucleotídica amplificable, una partícula tal como partícula de látex o carbono, sol metálico, cristalita, liposoma, célula, etc., que puede marcarse o no adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, un marcador de masa que altera el peso de la molécula con la que se conjuga para fines de espectrometría de masas, y similares. La etiqueta puede seleccionarse de materiales electromagnéticos o electroquímicos. En una realización, la etiqueta detectable es un colorante fluorescente. Otras etiquetas y esquemas de etiquetado serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la divulgación del presente documento.

25 Un resto detectable (elemento o componente) puede incluir cualquiera de las moléculas indicadoras enumeradas anteriormente y cualquier otro producto químico o componente que pueda usarse de cualquier manera para generar una señal detectable. El resto detectable, o etiqueta generadora de señal, puede detectarse mediante una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, o cualquier otra señal detectable que dependa de la identidad del resto. En caso de 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 actividad enzimática. En caso de 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. Las configuraciones de reactivos adecuadas para unión del resto detectable con una molécula diana incluyen unión covalente del resto detectable con la molécula diana, asociación no covalente del resto detectable con otro componente agente de etiquetado que está unido covalentemente con la molécula diana, y unión covalente del resto detectable con un componente de agente de etiquetado que esté asociado de forma no covalente con la molécula diana.

40 Pueden incorporarse restos detectables en un aptámero durante la síntesis usando dNTP etiquetados, colorantes que se han generado como fosforamiditas, u otras químicas que pueden emplearse durante la síntesis de oligonucleótidos, o pueden incorporarse por modificación del producto de aptámero final después de la síntesis. Cada aptámero puede incluir múltiples restos detectables para potenciar la generación de señal. Cuando van a detectarse múltiples dianas de la misma muestra, por ejemplo un corte histológico, entonces puede producirse cada aptámero específico diana con un resto detectable único para análisis simultáneo de múltiples dianas.

45 En algunas realizaciones, los aptámeros etiquetados hacen posible la tinción rápida y específica de muestras tisulares o celulares. Por ejemplo, en algunos casos puede conseguirse tinción de diana específica de cortes de tejido o preparaciones celulares en \leq aproximadamente 15 minutos, \leq aproximadamente 10 minutos, \leq aproximadamente 5 minutos y \leq aproximadamente 1 minuto. La tinción rápida es particularmente ventajosa en el diagnóstico de tejido anómalo o enfermo en una situación intraoperatoria.

50 Como se usa en el presente documento, “separación” significa cualquier proceso por el que uno o más componentes de una mezcla se separan de otros componentes de la mezcla. Por ejemplo, los aptámeros unidos a moléculas diana pueden separarse de otros ácidos nucleicos que no están unidos a moléculas diana y de moléculas no diana. Dicho más en general, la división permite la separación de todos los ácidos nucleicos en una mezcla candidata en al menos dos grupos basándose en su afinidad relativa y/o velocidad de disociación con la molécula diana. La división puede conseguirse por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo filtración, cromatografía de afinidad, división líquido-líquido, HPLC, etc. Por ejemplo, los pares de ácido nucleico-proteína pueden unirse con filtros de nitrocelulosa mientras que los ácidos nucleicos no unidos no. También pueden usarse para división columnas que retienen específicamente complejos de ácido nucleico-diana. 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 mayor afinidad. También pueden usarse perlas sobre las que se conjugan moléculas diana para dividir aptámeros en una mezcla. Si las perlas son paramagnéticas, la división puede conseguirse mediante aplicación de un campo magnético. Puede usarse tecnología de resonancia de plasmón superficial para dividir ácidos nucleicos en una mezcla inmovilizando una diana en una microplaca sensora y haciendo fluir la mezcla sobre la microplaca, en la que los ácidos nucleicos que tengan afinidad por la diana pueden unirse con la diana, y los ácidos nucleicos restantes pueden retirarse por lavado. También puede usarse división líquido-líquido así como

retardo de gel de filtración y centrifugación en gradiente de densidad. También pueden usarse marcadores de afinidad en las moléculas diana para separar moléculas de ácido nucleico unidas a la diana marcada de aptámeros que están libres en solución. Por ejemplo, las moléculas diana biotiniladas, junto con aptámeros unidos a ellas, pueden secuestrarse de la solución de secuencias de ácido nucleico no unidas usando perlas paramagnéticas de estreptavidina. También pueden incorporarse marcadores de afinidad en el aptámero durante la preparación. Cuando se usa SELEX tisular para producir aptámeros específicos para una o más dianas en un tejido biológico (corte de tejido o preparación celular), los ácidos nucleicos no específicos en una mezcla candidata pueden separarse de los aptámeros específicos de diana lavando la muestra tisular con una o más series de reactivos tamponados.

Como se usa en el presente documento, "photoSELEX" es un acrónimo de Evolución Sistemática Fotoquímica de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial y se refiere a realizaciones del proceso de SELEX en el que se generan aptámeros de fotoreticulación. En una realización del proceso de photoSELEX, se incorpora un nucleótido fotorreactivo activado por absorción de la luz en lugar de una base nativa en bibliotecas oligonucleotídicas aleatorias para ARN o en ADNmc, la molécula de ácido nucleico diana se irradia provocando que algunos ácidos nucleicos incorporados en complejos de ácido nucleico-molécula diana se reticulen con la molécula diana mediante los grupos funcionales fotorreactivos, y la etapa de selección es una selección con respecto a actividad de fotoreticulación. El proceso de photoSELEX se describe en gran detalle en las Patentes de PhotoSELEX.

Como se usa en el presente documento, "fotoaptámero" y "aptámero fotorreactivo" se usan indistintamente para hacer referencia a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que pueden unirse covalentemente con o "reticular" con una molécula diana. Por ejemplo, un resto de ácido nucleico de origen natural puede modificarse para incluir un grupo funcional químico que confiere fotorreactividad al resto de ácido nucleico tras exposición a una fuente de radiación de una longitud de onda apropiada. En algunas realizaciones, se identifica inicialmente un aptámero fotorreactivo. En otras realizaciones, se identifica en primer lugar un aptámero y posteriormente se modifica para incorporar uno o más grupos funcionales fotorreactivos, generando de este modo un fotoaptámero. En estas realizaciones, pueden incorporarse uno o más restos de ácido nucleico fotorreactivos en un aptámero bien por sustitución de un resto de ácido nucleico fotorreactivo en lugar de uno o más nucleótidos adicionales, tales como uno o más de los nucleótidos timidina y/o citidina en el aptámero, por ejemplo, o modificando uno o más restos de ácido nucleico para incluir un grupo funcional fotorreactivo.

En otras realizaciones más, ciertos nucleótidos pueden modificarse para producir aptámeros de velocidad de disociación lenta que se unen y forman una reticulación covalente con su diana en el complejo de afinidad. Este método abarca aptámeros de velocidad de disociación lenta que se unen con y después pueden ligarse a sus dianas respectivas. En diversas realizaciones, los aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden contener grupos fotorreactivos que son capaces de fotoreticular con la molécula diana tras irradiación con luz. En otras realizaciones, los aptámeros de velocidad de disociación lenta son capaces de formar enlaces con la diana en ausencia de irradiación. También puede producirse tras irradiación una interacción iónica estrecha entre el aptámero de velocidad de disociación lenta y la diana. También pueden usarse otros mecanismos para reticulación química. La reticulación de aptámero de velocidad de disociación lenta con su diana específica puede iniciarse por un activador de reticulación, tal como irradiación, o un agente químico específico. En una realización, se produce fotoreticulación debido a exposición a radiación electromagnética. La radiación electromagnética incluye luz ultravioleta, luz visible, rayos X y rayos gamma. Puede añadirse una etapa de reticulación al análisis de una muestra tisular o celular en cualquier punto en el procedimiento de ensayo.

Un grupo fotorreactivo puede ser cualquier estructura química que contenga un fotocromóforo y que sea capaz de fotoreticular con una diana. Aunque se denominan en el presente documento grupos fotorreactivos, en algunos casos, como se describe posteriormente, la irradiación no es necesaria para que se produzca unión covalente entre el aptámero de velocidad de disociación lenta y la diana. En algunas realizaciones, el grupo fotorreactivo absorberá luz de una longitud de onda que no absorbe la diana o las partes no modificadas del oligonucleótido. Los grupos fotorreactivos incluyen 5-halo-uridinas, 5-halo-citosinas, 7-halo-adenosinas, 2-nitro-5-acidobenzoilos, diazirinas, arilazidas, arilazidas fluoradas, benzofenonas, amino-benzofenonas, psoralenos, antraquinonas, etc.

Los grupos funcionales fotorreactivos a modo de ejemplo que pueden incorporarse por 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-acidodoguanina, 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-desaza-7-yodoaneninina, 7-desaza-ioguanina, 7-desaza-7-bromoadenina y 7-desaza-7-bromoguanina.

Además de estos de grupos funcionales fotorreactivos basados en nucleósidos a modo de ejemplo, también pueden usarse otros grupos funcionales fotorreactivos que pueden añadirse a un extremo terminal de un aptámero usando una molécula enlazadora apropiada. Dichos grupos funcionales fotorreactivos incluyen benzofenona, antraquinona, 4-azido-2-nitro-anilina, psoraleno, derivados de cualquiera de estos y similares.

Un grupo funcional fotorreactivo incorporado por un fotoaptámero puede activarse por cualquier método adecuado. En una realización, un fotoaptámero que contiene un grupo funcional fotorreactivo puede reticularse con su diana exponiendo el fotoaptámero y su molécula diana unida a una fuente de radiación electromagnética. Los tipos adecuados de radiación electromagnética incluyen luz ultravioleta, luz visible, rayos X y rayos gamma. Las fuentes de radiación adecuadas incluyen fuentes que utilizan luz monocromática o luz policromática filtrada.

Como se usa en el presente documento, la expresión “el proceso de SELEX de afinidad” se refiere a realizaciones del proceso de SELEX en el que se generan aptámeros no fotorreticulantes para dianas. En algunas realizaciones del proceso de SELEX de afinidad, la diana se inmoviliza en un soporte sólido bien antes o bien después de que se ponga en contacto la diana con la mezcla candidata de ácidos nucleicos. La asociación de la diana con el soporte sólido permite que ácidos nucleicos en la mezcla candidata que se han unido y en el caso de que se use un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta, permanezcan unidos a la diana para separar del resto de la mezcla candidata. La expresión “proceso de SELEX de afinidad de perlas” se refiere a realizaciones particulares del proceso de SELEX de afinidad en el que la diana se inmoviliza en una perla, por ejemplo, antes del contacto con la mezcla candidata de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, las perlas son perlas paramagnéticas. La expresión “proceso de SELEX de afinidad de filtro” se refiere a realizaciones en las que se separan complejos diana de ácido nucleico de 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 los ácidos nucleicos se ponen en contacto inicialmente en solución y se ponen en contacto con el filtro, y también incluye realizaciones en las que los ácidos nucleicos se ponen en contacto con la diana que está preinmovilizada en el filtro. La expresión “proceso de SELEX de afinidad de placa” se refiere a realizaciones en las que la diana está inmovilizada en la superficie de una placa, tal como, por ejemplo, una placa de microtitulación multipocillo. En algunas realizaciones, la placa está comprendida por poliestireno. En algunas realizaciones, la diana está unida a la placa en el proceso de SELEX de afinidad de placa mediante interacciones hidrófobas.

La presente divulgación describe métodos de SELEX mejorados para generar y usar aptámeros que son capaces de unirse con una o más dianas en una muestra celular o tisular. Más específicamente, la presente divulgación describe métodos para identificar aptámeros y/o fotoaptámeros que tienen velocidades de disociación más lentas de sus dianas respectivas que aptámeros obtenidos con métodos de SELEX previos. La divulgación describe además aptámeros y/o fotoaptámeros obtenidos usando los métodos descritos en el presente documento y métodos de uso de los mismos. Opcionalmente puede ser deseable confirmar la identidad de la diana específica seleccionada por el proceso de selección tisular mediante aislamiento, purificación y caracterización bioquímicas tradicionales. Estos métodos podrían incluir espectroscopia de masas, electroforesis bidimensional, etc.

En una realización, se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su diana, comprendiendo el método (a) preparar una mezcla candidata de secuencias de ácido nucleico; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una muestra tisular o celular en la que ácidos nucleicos con las mayores afinidades relativas con la diana de interés en dicha muestra tisular o celular se unen preferentemente con la diana, formando complejos de ácido nucleico-diana; (c) aplicar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para permitir la disociación de complejos de ácido nucleico-diana con velocidades de disociación relativamente rápidas; (d) dividir los complejos de ácido nucleico-diana restantes tanto de ácidos nucleicos libres como de moléculas no diana en la mezcla candidata; y (e) identificar un aptámero para la diana de interés. El proceso puede incluir además la etapa por iteraciones de amplificar los ácidos nucleicos que se unen con la diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos en secuencias que son capaces de unirse con la diana pero producen complejos de ácido nucleico-diana que tienen velocidades de disociación lentas. Como se ha definido anteriormente, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta puede seleccionarse de (a) diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana; (b) añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana, y diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) y añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana.

Opcionalmente, la muestra tisular o celular se fija antes de su uso en el proceso de selección de aptámero de velocidad de disociación lenta. Fijadores químicos pueden alterar epítomos diana de una manera predecible y reproducible que permite la selección de aptámeros que son específicos para la forma fijada del epítomo.

En una realización, se proporciona un método para producir un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su diana, comprendiendo el método (a) preparar una mezcla candidata de secuencias de ácido nucleico; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una muestra tisular o celular en la que ácidos nucleicos con las mayores afinidades relativas con la diana se unen preferentemente con la diana, formando complejos de ácido nucleico-diana; (c) aplicar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para permitir la disociación de complejos de ácido nucleico-diana con velocidades de disociación relativamente rápidas; (d) dividir los complejos de ácido nucleico-diana restantes tanto de ácidos nucleicos libres como de moléculas no diana en la mezcla candidata; y (e) producir un aptámero para la diana. El proceso puede incluir además la etapa por iteraciones de amplificar los ácidos nucleicos que se unen con la diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias que son capaces de unirse con la diana pero producen complejos de ácido nucleico-diana que tienen velocidades de disociación lentas. Como se ha definido anteriormente, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación

lenta puede seleccionarse de (a) diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana; (b) añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana, y diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana; (c) y añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana.

5 En una realización, se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su diana, comprendiendo el método: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una muestra tisular o celular, en la que ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana en relación con otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen con la diana, formando complejos de ácido nucleico-diana; (c) incubar la mezcla candidata y la diana juntas durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir unión en equilibrio; (d) aplicar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para permitir la disociación de complejos de ácido nucleico-diana con velocidades de disociación relativamente rápidas a la mezcla de (c); (e) incubar la mezcla de la mezcla candidata, los complejos de ácido nucleico-diana y la molécula competidora de (d) durante un periodo de tiempo predeterminado; (f) separar los complejos de ácido nucleico-diana de la mezcla candidata; (g) disociar los complejos de ácido nucleico-diana para generar ácidos nucleicos libres; (h) amplificar los ácidos nucleicos libres para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse con la diana con afinidad aumentada, por lo que puede identificarse un aptámero para la diana. Como se ha definido anteriormente, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta puede seleccionarse de (a) diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana; (b) añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana, y diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana; (c) y añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana.

25 En otra realización, se proporciona un método para producir un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su diana, comprendiendo el método: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una muestra tisular o celular, en la que ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana en relación con otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen con la diana, formando complejos de ácido nucleico-diana; (c) incubar la mezcla candidata y diana juntas durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir unión en equilibrio; (d) aplicar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para permitir la disociación de complejos de ácido nucleico-diana con velocidades de disociación relativamente rápidas a la mezcla de (c); (e) incubar la mezcla de la mezcla candidata, los complejos de ácido nucleico-diana y la molécula competidora de (d) durante un periodo de tiempo predeterminado; (f) dividir los complejos de ácido nucleico-diana de la mezcla candidata; (g) disociar los complejos de ácido nucleico-diana para generar ácidos nucleicos libres; (h) amplificar los ácidos nucleicos libres para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse con la diana con afinidad aumentada, por lo que puede producirse un aptámero para la diana. Como se ha definido anteriormente, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta puede seleccionarse de (a) diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana; (b) añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana, y diluir la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana; (c) y añadir al menos un competidor a la mezcla candidata que contiene los complejos de ácido nucleico-diana.

45 En otra realización, se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su 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 un, o cada, ácido nucleico de la mezcla candidata se modifica químicamente en la posición 5; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una muestra celular o tisular, en la que ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana en relación con otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen con la diana, formando complejos ácido nucleico-diana; (c) dividir los ácidos nucleicos de afinidad aumentada del resto de la mezcla candidata; y (d) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse con la diana con afinidad aumentada, por lo que puede identificarse un aptámero para la diana.

55 En otra realización, se proporciona un método para producir un aptámero que tiene una velocidad de disociación lenta de su diana, comprendiendo dicho método preparar o sintetizar un aptámero que incluye 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, ácido nucleico de la mezcla candidata se modifica químicamente en la posición 5; (b) poner en contacto la mezcla candidata con una muestra tisular o celular, en la que ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana en relación con otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se unen con la diana, formando complejos de ácido nucleico-diana; (c) dividir los ácidos nucleicos de afinidad aumentada del resto de la mezcla candidata; y (d) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse con la diana con afinidad aumentada, por lo que se identifica un aptámero para la diana.

En otra realización, se proporciona un complejo no covalente de un aptámero y su diana, en el que la semivida de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la diana se elige de uno de: más de o igual a aproximadamente 15 minutos; entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 30 minutos; 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; de aproximadamente 210 minutos a aproximadamente 240 minutos.

En otra realización, se proporciona un complejo no covalente de un aptámero y una diana, en el que el aptámero tiene una K_d por la diana de aproximadamente 100 nM o menos, en el que la semivida de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la diana es mayor de o igual a aproximadamente 15 minutos, y en el que una, varias o todas las pirimidinas en la secuencia de ácido nucleico del aptámero están modificadas en la posición 5 de la base. Las modificaciones pueden seleccionarse del grupo de compuestos mostrado en la FIGURA 14, estas modificaciones se denominan "nucleótidos modificados basándose en el documento WO 2011/006075 PCT/US2010/041540". Pueden diseñarse aptámeros con cualquier combinación de las pirimidinas modificadas en base deseadas.

Se desvelan métodos mejorados para realizar SELEX con nucleótidos modificados, incluyendo nucleótidos que contienen grupos fotoactivos o nucleótidos que contienen marcadores de lugar para grupos fotoactivos en el documento US2009/0098549 titulado "Improved SELEX and PHOTOSELEX" presentado el 17 de julio de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En otra realización, la mezcla candidata de moléculas de ácido nucleico incluye ácidos nucleicos que contienen bases nucleotídicas modificadas que pueden ayudar en la formación de complejos de ácido nucleico-diana modificados con velocidades de disociación relativamente lentas.

Los diversos métodos y etapas descritos en el presente documento pueden usarse para generar un aptámero capaz de (1) unirse con una molécula diana o (2) unirse con una molécula diana y posteriormente formar 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 de diagnóstico y terapéuticos. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta se unirán con la diana durante un tiempo más tiempo. Esto es útil en métodos de diagnóstico en los que la unión de un aptámero con la diana puede usarse para detectar la presencia, ausencia, cantidad o volumen de la molécula diana y una interacción prolongada del aptámero y la diana facilita dicha detección. Puede producirse una ventaja adicional cuando se usan aptámeros de velocidad de disociación lenta en métodos de captura de imágenes, *in vitro* o *in vivo*. Una interacción prolongada de aptámero y diana también proporciona métodos terapéuticos mejorados de tratamiento en los que la interacción prolongada puede permitir un efecto terapéutico mejorado, por ejemplo debido a la activación o inhibición más larga de la molécula diana o cascada de señalización corriente abajo. Estos aptámeros de velocidad de disociación lenta y aptámeros con alta afinidad pueden usarse en métodos de detección e identificación molecular citológica e histológica.

En consecuencia, en diversas realizaciones, pueden usarse aptámeros de velocidad de disociación lenta, obtenidos, identificados o producidos por los métodos descritos en diversos métodos de tratamiento médico o métodos de diagnóstico (*in vitro* o *in vivo*). En una realización, pueden usarse aptámeros de velocidad de disociación lenta en un método de tratamiento de enfermedad. En una realización, pueden usarse aptámeros de velocidad de disociación lenta en un método de diagnóstico de enfermedad *in vivo*. En otra realización, pueden usarse aptámeros de velocidad de disociación lenta *in vitro* para el diagnóstico de enfermedad. En otra realización, puede usarse un aptámero de velocidad de disociación lenta en la fabricación de un producto terapéutico (por ejemplo composición farmacéutica) o en la fabricación de un agente de diagnóstico para uso en un método de tratamiento o diagnóstico de la enfermedad. Las aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas de aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden implicar un resultado de diagnóstico o terapéutico que depende de la unión específica y/o de alta afinidad del aptámero de velocidad de disociación lenta con su diana. También pueden usarse aptámeros de velocidad de disociación lenta en validación de diana y ensayos de exploración de alto rendimiento en el proceso de desarrollo de fármacos.

En una realización, los aptámeros de velocidad de disociación lenta son reactivos adecuados para captura de imágenes moleculares *in vivo*. En esta realización, puede usarse un aptámero de velocidad de disociación lenta *in vivo* para detectar la presencia de una patología, proceso de enfermedad u otra afección en el cuerpo de un individuo (por ejemplo, un ser humano o un animal), en el que la unión del aptámero con su diana indica la presencia del proceso de enfermedad u otra afección. Por ejemplo, puede usarse un aptámero para el receptor de VEGF *in vivo* para detectar la presencia de cáncer en un área particular (por ejemplo, un tejido, un órgano, etc.) del cuerpo de un individuo, ya que el receptor de VEGF se expresa abundantemente dentro de tumores y su neovasculatura, o un aptámero para el receptor de EGF puede usarse *in vivo* para detectar la presencia de cáncer en un área particular (por ejemplo, un tejido, un órgano, etc.) del cuerpo de un individuo, ya que el receptor de EGF se expresa con frecuencia a altos niveles en células tumorales. Es decir, la diana molecular será el dominio extracelular (ECD) de un receptor inducido, ya que dichas dianas se localizan fuera de las células y son accesibles a través de la vasculatura.

Adicionalmente, los ECD tienden a localizarse en el sitio de patología, incluso aunque puede desprenderse una fracción pequeña del ECD específico mediante procesos biológicos, incluyendo muerte celular.

5 Los candidatos evidentes para captura de imágenes moleculares, anticuerpos monoclonales de alta afinidad, no se han convertido en el reactivo elegido para esta aplicación. Los reactivos de captura de imágenes moleculares tienen requisitos precisos. Deben tener alta actividad de unión para su diana pretendida, y baja actividad de unión para otras dianas en un ser humano o animal. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta tienen ventajas únicas que los hacen deseables para uso en captura de imágenes molecular *in vivo*. Por un lado, se seleccionan para tener constantes de velocidad de disociación lenta, permitiendo de este modo la residencia *in vivo* en la diana pretendida
10 durante un periodo de tiempo sustancial (al menos aproximadamente 15 minutos). Por otro lado, se espera que los aptámeros de velocidad de disociación lenta tengan eliminación muy rápida de la vasculatura. Las constantes de velocidad de disociación lenta y eliminación rápida de la vasculatura son dos propiedades deseadas para capturar imágenes moleculares *in vivo*. Desde una perspectiva cinética, buenos reactivos de captura de imágenes moleculares *in vivo* deben permanecer localizados en el sitio de la patología mientras que la concentración de reactivo libre en la vasculatura circundante se reduce. Esta es una restricción de señal con respecto a ruido. Pueden obtenerse relaciones de señal con respecto a ruido adecuadas por acumulación de señal en el sitio de patología en exceso de la señal en la vasculatura, o pueden obtenerse por conservación de una señal en el sitio de la patología mientras que se reduce la concentración en la vasculatura.

20 Se han estudiado aptámeros que no tienen propiedades de velocidad de disociación lenta, de aproximadamente el mismo peso molecular y carga neta que los aptámeros de velocidad de disociación lenta, en animales y seres humanos durante más de una década. En general, se ha descubierto que estos aptámeros se eliminan de la vasculatura rápidamente, habitualmente al entrar en el riñón y/o el hígado y metabolizarse adicionalmente después para excreción. Dichos aptámeros muestran la eliminación llamada “de primer pase” a no ser que se ligan aductos de alto peso molecular (tales como, por ejemplo, PEG) a los aptámeros. Se han realizado experimentos con un aptámero cuya diana es tenascina C, una proteína extracelular (no un ECD) hallada a altas concentraciones en algunos tumores. En esos experimentos, el aptámero específico de tenascina C se eliminaba rápidamente y podía conservarse en el sitio del tumor debido a que la concentración local extracelular de tenascina C es muy alta. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta, por el contrario, mantendrán la velocidad de eliminación rápida de los
25 aptámeros, pero ofrecerán una ventaja cinética debido a sus velocidades de disociación lentas, haciéndolos adecuados para uso con dianas cuya presencia en el sitio de interés (por ejemplo, el sitio de patología) puede ser algo escasa (ECD en tumores, por ejemplo).

35 Los reactivos alternativos para captura de imágenes moleculares no comparten las dos propiedades de aptámeros de velocidad de disociación lenta (es decir, velocidad de disociación lenta y eliminación rápida del cuerpo). Los anticuerpos monoclonales tienen con frecuencia alta afinidad y especificidad, y pueden tener constantes de velocidad de disociación lentas; sin embargo, los anticuerpos monoclonales tienen velocidades de eliminación de la vasculatura muy lentas. Los péptidos cortos, identificados mediante, por ejemplo, presentación en fagos, pueden tener eliminación rápida pero escasa afinidad y especificidad y velocidades de disociación rápidas de sus dianas pretendidas. Los aficuerpos, una versión peptídica particular de un mimético de anticuerpo, pueden tener afinidad y especificidad razonables y pueden tener eliminación más rápida que los anticuerpos monoclonales, pero para conseguir las velocidades de disociación lentas de sus dianas, los aficuerpos se convierten con frecuencia en dímeros y multímeros de mayor orden, ralentizando su eliminación al mismo tiempo que se potencian sus velocidades de disociación.

45 Pueden usarse aptámeros de velocidades de disociación lenta para captura de imágenes moleculares *in vivo* con uno o más aductos de bajo peso molecular tanto para proteger el aptámero de velocidad de disociación lenta de nucleasas en el cuerpo como para detectar la diana pretendida una vez que esté unida al aptámero de velocidad de disociación lenta. Por ejemplo, los aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden unirse con nucleasas en la sangre, normalmente exonucleasas (para ADN) que se bloquean fácilmente usando aductos refractarios a exonucleasa en las posiciones 5' y 3' terminales del aptámero de velocidad de disociación lenta, o endonucleasas (para ARN) que se bloquean fácilmente incorporando pirimidinas refractarias a endonucleasa (tales como, por ejemplo, 2' fluoro nucleótidos) en el aptámero de velocidad de disociación lenta. La detección del complejo de aptámero de velocidad de disociación lenta-diana puede conseguirse uniendo un resto de detección con el 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 captura de imágenes por 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 pretendida deberían diseñarse de modo que no interfieran con la interacción del aptámero de velocidad de disociación lenta con su diana y no provoquen que el aptámero de velocidad de disociación lenta se elimine demasiado lentamente de la vasculatura.

65 También se proporcionan dispositivos de diagnóstico o ensayo, por ejemplo columnas, tiras de ensayo o microplacas biológicas, que tienen uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta adheridos a una superficie sólida del dispositivo. El aptámero o los aptámeros pueden situarse de modo que sean capaces de unirse con moléculas diana que están en contacto con la superficie sólida para formar complejos de aptámero-diana que

permanecen adheridos a la superficie del dispositivo, capturando de este modo la diana y permitiendo la detección y opcionalmente cuantificación de la diana. Puede proporcionarse una serie de aptámeros de velocidad de disociación lenta (que pueden ser iguales o diferentes) en dicho dispositivo.

- 5 En otra realización, se proporcionan complejos que incluyen un aptámero de velocidad de disociación lenta y una molécula diana. En otras realizaciones, se proporciona una clase de aptámeros caracterizada por tener alta afinidad por sus moléculas diana correspondientes y velocidades de disociación lentas ($t_{1/2}$) de un complejo no covalente del aptámero y diana.
- 10 El proceso de SELEX básico generalmente comienza con la preparación de una mezcla candidata de ácidos nucleicos de secuencia diferente. La mezcla candidata generalmente incluye secuencias de ácido nucleico que incluyen dos regiones fijas (es decir, cada uno de los miembros de la mezcla candidata contiene las mismas secuencias en la misma localización) y una región variable. Típicamente, las regiones de secuencia fijas se seleccionan de modo que ayuden en las etapas de amplificación descritas posteriormente, o potencien el potencial de una disposición estructural dada de los ácidos nucleicos en la mezcla candidata. La región variable normalmente proporciona la región de unión a diana de cada ácido nucleico en la mezcla candidata, y esta región variable puede ser completamente aleatoria (es decir, la probabilidad de encontrar una base en cualquier posición es de una en cuatro) o solamente parcialmente aleatoria (por ejemplo, la probabilidad de encontrar una base en cualquier localización puede seleccionarse en cualquier nivel entre 0 y 100 por cien). La mezcla candidata preparada se pone en contacto con la diana seleccionada en condiciones que son favorables para que se produzca unión entre la diana y miembros de la mezcla candidata. En estas condiciones, la interacción entre la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla candidata generalmente forma pares de ácido nucleico-diana que tienen la afinidad relativa más fuerte entre miembros del par. Los ácidos nucleicos con la mayor afinidad por la diana se separan de los ácidos nucleicos con menor afinidad con la diana. El proceso de división se realiza de una manera que conserva el número máximo de candidatos de alta afinidad. Los ácidos nucleicos seleccionados durante la división por tener una afinidad relativamente alta con la diana se amplifican para crear una nueva mezcla candidata que se enriquece en ácidos nucleicos que tienen una alta afinidad relativa por la diana. Repitiendo las etapas de división y amplificación anteriores, la mezcla candidata recién formada contiene cada vez menos secuencias únicas, y el grado promedio de afinidad de la mezcla de ácido nucleico con respecto a la diana generalmente aumentará. Llevado a su extremo, el proceso de SELEX producirá 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 tienen la mayor afinidad con la molécula diana. Sin embargo, este proceso de SELEX básico no selecciona aptámeros que tienen velocidades de disociación lentas de sus dianas.
- 35 Las Patentes de SELEX y Patentes de PhotoSELEX describen y desarrollan este proceso con gran detalle. Estas patentes incluyen descripciones de las diversas dianas que pueden usarse en el proceso; métodos para la preparación de la mezcla candidata inicial; métodos para dividir ácidos nucleicos dentro de una mezcla candidata; y métodos para amplificar ácidos nucleicos divididos para generar mezclas candidatas enriquecidas. Las Patentes de SELEX también describen soluciones de aptámeros obtenidas para varios tipos diferentes de moléculas diana, incluyendo dianas proteicas en las que la proteína es y no es una proteína de unión a ácido nucleico. En referencia a la FIGURA 2, el proceso de SELEX modificado desvelado en el presente documento incluye la introducción de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta después del equilibrado de la mezcla candidata de ácidos nucleicos con la diana o las dianas y una etapa de división previa a las etapas posteriores en el proceso de SELEX. La introducción de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta al proceso de SELEX básico proporciona un medio para enriquecimiento de complejos de afinidad de aptámero con velocidades de disociación lenta de un conjunto de complejos de ácido nucleico-diana que incluye diversas velocidades de disociación. Por lo tanto, el proceso de SELEX modificado proporciona un método para identificar aptámeros que se unen con moléculas diana y, una vez unidos, tienen velocidades de disociación relativamente lentas de la molécula diana.
- 50 Como se usa en el presente documento "unión" se refiere en general a la formación de una asociación no covalente entre el ligando y la diana, aunque dicha unión no es necesariamente reversible. Las expresiones "complejo de ácido nucleico-diana" o "complejo" o "complejo de afinidad" se usan para hacer referencia al producto de dicha asociación de unión no covalente.
- 55 En diversas realizaciones, los aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden ser oligonucleótidos de ARN o ADN mono o bicatenarios. Los aptámeros pueden contener bases no convencionales o modificadas. Además, los aptámeros pueden contener cualquier tipo de modificación. Como se usa en el presente documento, una "base modificada" puede incluir una modificación relativamente sencilla de un resto de ácido nucleico natural, confiriendo dicha modificación un cambio en las propiedades físicas del resto de ácido nucleico. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones en la posición 5 de pirimidinas, sustitución con grupos hidrófobos, por ejemplo, bencilo, isobutilo, indol o naftilmetilo, o sustitución con grupos hidrófilos, por ejemplo amina cuaternaria o guanidinio, o grupos más "neutros", por ejemplo, imidazol y similares. Pueden estar presentes modificaciones adicionales en el anillo de ribosa, por ejemplo, posición 2', tal como 2'-amino (2'-NH₂) y 2'-fluoro (2'-F) o la cadena principal de fosfodiéster, por ejemplo, fosforotioatos o metilfosfonatos.
- 65

En diversas realizaciones, una mezcla candidata que contiene un conjunto aleatorio de secuencias de ácido nucleico que contiene bases nucleotídicas modificadas se mezcla con una cantidad de la molécula diana y se permite que establezca equilibrio de unión con la molécula diana. En general, solamente algunos de los ácidos nucleicos que se unen con alta afinidad con la molécula diana se dividirán eficazmente con la diana.

5 En diversas realizaciones, 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
10 pueden contener bases nucleotídicas modificadas, o pueden contener el conjunto convencional de bases de origen natural.

En algunas realizaciones, se produce amplificación después de haberse dividido miembros de la mezcla de ensayo, y lo que se amplifica es el ácido nucleico. Por ejemplo, puede llevarse a cabo amplificación de moléculas de ARN por una secuencia de tres reacciones: realizar copias de ADNc de ARN seleccionados, usar 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. Puede usarse cualquier reacción o combinación de reacciones conocida en la técnica según sea apropiado, incluyendo replicación de ADN directa, amplificación de ARN directa y similares, como se reconocerá por los expertos en la materia. El método de
15 amplificación puede dar como resultado las proporciones de la mezcla amplificada que son representativas de las proporciones de secuencias diferentes en la mezcla antes de la amplificación. Se sabe que muchas modificaciones de ácidos nucleicos son compatibles con amplificación enzimática. Pueden realizarse modificaciones que no son compatibles con la amplificación después de cada ciclo de amplificación, si es necesario.

25 La mezcla candidata de ácido nucleico puede modificarse de diversas maneras para potenciar la probabilidad de que los ácidos nucleicos tengan propiedades facilitadoras u otras propiedades deseables, particularmente las 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, capacidad de polarización, enlaces de hidrógeno o interacción electrostática correctos para potenciar las interacciones de ligando-diana deseadas. Las modificaciones
30 que pueden potenciar las propiedades de unión, incluyendo la afinidad y/o velocidades de disociación, del ácido nucleico, por ejemplo, incluyen restos hidrófilos, restos hidrófobos, estructuras rígidas, grupos funcionales hallados en proteínas tales como imidazoles, alcoholes primarios, carboxilatos, grupos de guanidinio, grupos amino, tioles y similares. También pueden usarse modificaciones para aumentar la supervivencia de complejos de aptámero-diana bajo presiones de selección rigurosas que pueden aplicarse para producir aptámeros de velocidad de disociación lenta a una amplia serie de dianas. En una realización, se usa BndU (5-(N-bencilcarboxiamida)-dU) en la generación de las mezclas candidatas usadas para producir aptámeros de velocidad de disociación lenta, aunque otros nucleótidos modificados están bien adaptados a la producción de dichos aptámeros. Otros nucleótidos modificados se muestran en la FIGURA 14. Una mezcla candidata de nucleótidos modificados para el fin de esta solicitud es cualquier mezcla candidata de ARN o ADN que incluya nucleótidos tanto de origen natural como distintos de los de
40 origen natural. Las modificaciones adecuadas incluyen modificaciones en cada resto del ácido nucleico, en un único resto del ácido nucleico, en restos aleatorios, en todas las pirimidinas o todas las purinas, 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 pueda ser adecuado para una aplicación particular. Se reconoce que la modificación no es un prerrequisito para facilitar la actividad o capacidad de unión de los aptámeros. Los aptámeros pueden incluir restos de dUTP y dCTP modificados.
45

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 base C-5. La modificación de C-5 puede introducirse mediante un enlace de amida, directa o indirectamente, o mediante otro tipo de enlace. Estas mezclas candidatas se usan en un proceso de 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. Pueden producirse mezclas candidatas enzimáticamente o sintéticamente.
50

Como se ha descrito anteriormente, los nucleótidos pueden modificarse de varias maneras, incluyendo modificaciones de la ribosa y/o posiciones de fosfato y/o base. Se describen ciertas modificaciones en la Patente de Estados Unidos n.º 5.660.985 titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", Patente de Estados Unidos n.º 5.428.149 titulada "Method for Palladium Catalyzed Carbon-Carbon Coupling and Products", Patente de Estados Unidos n.º 5.580.972 titulada "Purine Nucleoside Modifications by Palladium Catalyzed Methods". En una realización, las modificaciones son en las que otro grupo químico está unido a la posición 5 de una pirimidina o la posición 2' de un azúcar. No hay ninguna limitación sobre el tipo de otro grupo químico que puede incorporarse en los nucleótidos individuales. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado resultante es amplificable o puede modificarse posteriormente a las etapas de amplificación (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.300.074 titulada "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Chemi-SELEX").
60

65 En otras realizaciones más, ciertos nucleótidos se modifican para producir aptámeros que se unen y forman una reticulación covalente con su molécula diana tras fotoactivación del complejo de afinidad. Este método abarca

aptámeros que se unen con, fotorreticulan con y/o fotoactivan moléculas diana. En diversas realizaciones, los aptámeros contienen grupos fotorreactivos que son capaces de fotorreticular con la molécula diana tras irradiación con luz. En otras realizaciones, los aptámeros tienen capacidad de formación de enlaces con la diana en ausencia de irradiación.

5 Un grupo fotorreactivo puede ser cualquier estructura química que contenga un fotocromóforo y que sea capaz de fotorreticular con una molécula diana. Aunque se denomina en el presente documento grupo fotorreactivo, en algunos casos, como se describe posteriormente, la irradiación no es necesaria para que se produzca unión covalente entre el aptámero y la diana. En algunas realizaciones, el grupo fotorreactivo absorberá luz de una
10 longitud de onda que no absorbe la diana o las partes modificadas del oligonucleótido. Los grupos fotorreactivos incluyen 5-halo-uridinas, 5-halo-citosinas, 7-halo-adenosinas, 2-nitro-5-azidobenzóilos, diazirinas, arilazidas, arilazidas fluoradas, benzofenonas, amino-benzofenonas, psoralenos, antraquinonas, etc.

15 Los grupos fotorreactivos generalmente forman enlaces con la diana tras irradiación del par de ácido nucleico-diana asociado. En algunos casos, no se requiere irradiación para que se produzca formación de enlaces. El fotorreticulado 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 irradiación.

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

En diversas otras realizaciones, una selección limitada de oligonucleótidos usando un método SELEX se sigue de selección usando un método de photoSELEX. Los ciclos de selección de SELEX inicial se realizan con
25 oligonucleótidos que contienen grupos fotorreactivos. Después de varios ciclos de SELEX, se realiza photoSELEX para seleccionar oligonucleótidos capaces de unirse con la molécula diana. En otra realización, se describe la producción de un aptámero que incluye una sección escindible o liberable (también descrita como un elemento o componente) en la secuencia de aptámeros. Estos componentes o elementos adicionales son elementos o
30 componentes estructurales que introducen funcionalidad adicional en el aptámero y son por lo tanto elementos o componentes funcionales. El aptámero se produce adicionalmente con uno o más de los siguientes componentes adicionales (también descritos como un elemento funcional o estructural o componente o resto en cualquier combinación de estos términos): un componente marcado o detectable, un componente espaciador y un marcador de unión específico o elemento o componente de inmovilización.

35 Como se ha indicado anteriormente, la presente divulgación proporciona métodos para identificar aptámeros que se unen con una o más dianas de interés dentro de una muestra celular o tisular y una vez unidos tienen velocidades de disociación lentas. Las velocidades de disociación lentas obtenidas con este método pueden superar una semivida de aproximadamente una hora y hasta aproximadamente 240 minutos, es decir, una vez que se genera un conjunto de complejos de ácido nucleico-diana, la mitad de los complejos en el conjunto permanecerán unidos
40 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 complejos de afinidad de aptámero, la duración del proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se elige para que conserve una alta proporción de complejos de afinidad de aptámero con velocidades de disociación lentas reduciendo al mismo tiempo sustancialmente el número de complejos de afinidad de aptámero con velocidades de disociación rápidas. Por ejemplo, la incubación de
45 la mezcla durante periodos relativamente más largos de tiempo después de imponer el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta seleccionará aptámeros con velocidades de disociación más largas que aptámeros seleccionados usando el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta que tiene periodos de incubación más cortos.

50 En diversas realizaciones, la mezcla candidata se mezcla con una cantidad de la muestra celular o tisular y se permite que establezca equilibrio de unión con la diana o las dianas de interés. Antes de separar los ácidos nucleicos unidos a diana de los libres en solución, se impone un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta para enriquecer la población unida para velocidades de disociación lentas. Como se ha indicado anteriormente, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta puede aplicarse por la adición de una
55 molécula competidora, por dilución de muestras, por una combinación de dilución de muestras en presencia de una molécula competidora. Por lo tanto, en una realización, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se aplica introduciendo moléculas competidoras a la mezcla que contiene los complejos de ácido nucleico-diana e incubando la mezcla durante algún periodo de tiempo antes de liberar por división de ácidos nucleicos unidos. La cantidad de moléculas competidoras es generalmente al menos de un orden de magnitud mayor que el
60 de las moléculas de ácido nucleico y puede ser de dos o más órdenes de magnitud mayor. En otra realización, el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se aplica diluyendo la mezcla de muestras de complejos de ácido nucleico-diana varias veces (por ejemplo, al menos aproximadamente una de 2x, 3x, 4x, 5x) en volumen e incubando la mezcla durante algún periodo de tiempo antes de separar ácidos nucleicos libres de unidos. El volumen de dilución es generalmente al menos un orden de magnitud mayor, y puede ser de aproximadamente
65 dos o más órdenes de magnitud mayores, que el volumen original. En otra realización más, se usa una combinación de ambas moléculas competidoras y dilución para aplicar el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación

lenta. En otra realización, se usan mezclas candidatas que se ha mostrado que dan como resultado una frecuencia aumentada de aptámeros de disociación lenta para seleccionar varios aptámeros candidatos. Estos aptámeros se exploran para identificar aptámeros de velocidad de disociación lenta.

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

- 15 Un elemento o resto o componente "liberable" o "escindible" se refiere a un grupo funcional en el que ciertos enlaces en el grupo funcional pueden dividirse para producir 2 componentes separados. En diversas realizaciones, el grupo funcional puede escindirse irradiando el grupo funcional (fotoescindible) a la longitud de onda apropiada o mediante tratamiento con los reactivos químicos o enzimáticos apropiados. En otra realización, el elemento liberable puede ser un enlace disulfuro que puede tratarse con un agente reductor para romper el enlace. El elemento liberable permite que un complejo de afinidad de aptámero/diana que está unido con un soporte sólido se separe del soporte sólido, tal como mediante elución del complejo. El elemento liberable puede ser estable a las condiciones del resto del ensayo y puede ser liberable en condiciones que no rompan el complejo de aptámero/diana.

- 25 Como se desvela 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 que se una con él) a un soporte sólido. Un "marcador" es un conjunto de copias de un tipo o especie de componente que es capaz de asociarse con una sonda. "Marcadores" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de componentes. El marcador puede unirse con o incluirse en el aptámero por cualquier método adecuado. En general, el marcador permite que el aptámero se asocie, directa o indirectamente, con una sonda o un receptor que esté unido al soporte sólido. La sonda puede ser altamente específica en su interacción con el marcador y conservar esa asociación durante todas las etapas de procesamiento o procedimientos posteriores. Un marcador puede permitir la localización de un complejo de afinidad de aptámero (o complejo de afinidad de aptámero covalente opcional) a una dirección espacialmente definida en un soporte sólido. Diferentes marcadores, por lo tanto, pueden permitir la localización de diferentes complejos covalentes de aptámero en diferentes direcciones espacialmente definidas en 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 pueda diseñarse o configurarse una sonda (o molécula enlazadora, como se describe posteriormente) para unirse o asociarse de otro modo con especificidad. En general, se configura un marcador de modo que no interactúe intramolecularmente consigo mismo o el aptámero con el que se une o del que es parte. Si se usa SELEX para identificar un aptámero, el marcador puede añadirse al aptámero bien antes o bien después de SELEX. El marcador se incluye en el extremo 5' del aptámero post SELEX, o el marcador se incluye en el extremo 3' del aptámero post SELEX, o los marcadores pueden incluirse en los extremos tanto 3' como 5' de los aptámeros en un proceso post SELEX. Como se ilustra en la FIGURA 9D, un colorante fluorescente (tal como Cy3), los restos fotoescindibles y de biotina se añaden todos al extremo del aptámero. Debido a interacciones potenciales entre el resto fotoescindible y el colorante, se inserta un espaciador entre estos dos restos. Todas las construcciones pueden sintetizarse usando química de fosforamidita convencional. Se muestran construcciones de aptámeros representativas en la FIGURA 10A a FIGURA 10F. La funcionalidad puede dividirse entre el extremo 5' y 3' o combinarse en uno de los extremos. Además de restos fotoescindibles, pueden usarse otros restos escindibles, incluyendo restos escindibles química o enzimáticamente. Pueden usarse diversos restos espaciadores y pueden incluirse uno o más restos de biotina. También pueden incorporarse marcadores (también denominados elementos o componentes de inmovilización o unión específica) distintos de biotina. Los reactivos de construcción adecuados incluyen fosforamidita de biotina, enlazador PC (Glen Research PN 10-4920-02); fosforamidita de biotina PC (Glen Research PN 10-4950-02); fosforamidita dSpacer CE (Glen Research PN 10-1914-02); fosforamidita de Cy3 (Glen Research PN 10-5913-02); y Amidita Espaciadora Arm26-Ach (Fidelity Systems PN SP26Ach-05). Este tipo de marcador en un aptámero de velocidad de disociación lenta específico de diana puede usarse para introducir reactivos secundarios, tales como una etiqueta, en una muestra tisular o celular. Por ejemplo si el aptámero de velocidad de disociación lenta contiene un marcador de biotina, podría introducirse una molécula de avidina etiquetada para generar señal.

- 60 En una realización, se usan modificaciones de bases de los nucleótidos en la producción de la región variable del aptámero. Se ha mostrado que estos nucleótidos modificados producen aptámeros que tienen velocidades de disociación muy lentas de sus dianas. En los métodos de la presente divulgación la mezcla candidata puede comprender ácidos nucleicos modificados en los que una, varias (por ejemplo una de, o al menos una 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, ácido nucleico de la mezcla candidata se modifica químicamente en la posición 5.

Opcionalmente, todos los restos C en los ácidos nucleicos de la mezcla candidata se modifican químicamente en la posición 5. Opcionalmente, todos los restos T en los ácidos nucleicos de la mezcla candidata se modifican químicamente en la posición 5. Opcionalmente, todos los restos U en los ácidos nucleicos de la mezcla candidata se modifican químicamente en la posición 5.

5 Un “especímenes o muestra citológica” puede incluir una amplia serie de tipos de especímenes. Estas incluyen lavados abdominales y pélvicos, líquidos de cavidades corporales (pleural, peritoneal), orina, lavados gástricos/esofágicos, aspirados por aguja fina (FNA), líquido mamario, LCR, líquido quístico, líquido sinovial y lavados bronquiales. Pueden prepararse frotis a partir de especímenes FNA o especímenes recogidos por cepillo como se realiza para frotis PAP.

15 Un “protocolo de citología” generalmente consiste en recogida de muestras, fijación de muestras, inmovilización de muestras y tinción. La “preparación celular” puede incluir todas las etapas de procesamiento después de recogida de muestras incluyendo el uso de uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta para la tinción de las células preparadas.

20 La recogida de muestras puede implicar colocar directamente la muestra en un recipiente de transporte no tratado, colocar la muestra en un recipiente de transporte que contiene algún tipo de medio, o colocar la muestra directamente en un portaobjetos (inmovilización) sin ningún tratamiento o fijación.

25 La inmovilización de la muestra puede mejorarse aplicando una parte del especímenes recogido a un portaobjetos de vidrio que se trata con polilisina, gelatina o un silano. Pueden prepararse portaobjetos extendiendo una capa fina y uniforme de células a través del portaobjetos. Se tiene cuidado de minimizar la distorsión mecánica y los artefactos de secado. Los especímenes líquidos pueden procesarse en un método de bloqueo celular o los especímenes líquidos pueden mezclarse 1:1 con la solución fijadora durante 10 minutos a temperatura ambiente.

30 Pueden prepararse bloques celulares a partir de efusiones residuales, esputo, sedimentos de orina, fluidos gastrointestinales, raspado celular o aspirados por aguja fina. Las células se concentran o se empaquetan por centrifugación o filtración de membrana. Se han desarrollado varios métodos para preparación de bloques celulares. Los procedimientos representativos incluyen el sedimento fijado, agar bacteriano o métodos de filtración de membrana. En el método de sedimento fijado, el sedimento celular se mezcla con un fijador como Bouin, ácido picrico o formalina tamponada y después la mezcla se centrifuga para sedimentar las células fijadas. El sobrenadante se retira, secando el sedimento celular tan completamente como sea posible. El sedimento se recoge y se envuelve en papel para limpiar lentes y después se coloca en un casete tisular. El casete tisular se coloca en un tarro con fijador adicional y se procesa como una muestra tisular. El método de agar es muy similar pero el sedimento se retira y se seca en papel de cocina y después se corta por la mitad. El lado cortado se coloca en una gota de agar fundido en un portaobjetos de vidrio y después se cubre el sedimento con agar asegurando que no se formen burbujas en el agar. Se permite que el agar se endurezca y después se recorta cualquier exceso de agar. Este se coloca en un casete tisular y se completa el proceso tisular. Como alternativa, el sedimento puede suspenderse directamente en agar líquido al 2 % a 65 °C y centrifugarse la muestra. Se permite que el sedimento celular de agar se solidifique durante una hora a 4 °C. El agar sólido puede después retirarse del tubo de centrifuga y cortarse por la mitad. El agar se envuelve en papel de filtro y después el casete tisular. El procesamiento de esta etapa es como anteriormente. Las etapas de centrifugación pueden reemplazarse en cualquiera de estos procedimientos con una etapa de filtración de membrana. Cualquiera de estos procesos puede usarse para generar una “muestra de bloque celular”.

50 Pueden prepararse bloques celulares usando resinas especializadas incluyendo resinas de Lowicryl, LR White, LR Gold, Unicryl y MonoStep. Estas resinas tienen baja viscosidad y pueden polimerizarse, a bajas temperaturas y con luz ultravioleta (UV). El proceso de inclusión se basa en enfriar progresivamente la muestra durante las etapas de deshidratación, transferir la muestra a la resina y polimerizar un bloque a la baja temperatura final a la longitud de onda de UV apropiada.

55 Las secciones de bloques celulares pueden teñirse con hematoxilina-eosina para examen citomorfológico mientras que se usan secciones adicionales para examen con respecto a marcadores específicos.

60 Si el proceso es citológico o histológico, la muestra puede fijarse antes del procesamiento adicional para prevenir la degradación de muestras. Esta etapa se denomina “fijación” y describe una amplia serie de materiales y procedimientos que pueden usarse indistintamente. El protocolo de fijación de muestras y los reactivos se seleccionan mejor de forma empírica basándose en las dianas para detectar y el tipo celular/tisular específico para analizar. La fijación de muestra se basa en reactivos tales como etanol, polietilenglicol, metanol, formalina o isopropanol. Las muestras deberían fijarse tan pronto después de la recogida y fijación al portaobjetos como sea posible. Sin embargo, el fijador seleccionado puede introducir cambios estructurales en diversas dianas moleculares haciendo su detección posterior más difícil. Los procesos de fijación e inmovilización y su secuencia pueden modificar la apariencia de la célula y estos cambios deben anticiparse y reconocerse por el citotecnólogo. Los fijadores pueden provocar encogimiento de ciertos tipos celulares y provocar que el citoplasma aparezca granular o reticular. Muchos fijadores actúan reticulando componentes celulares. Esto puede dañar o modificar epítomos

específicos, generar nuevos epítomos, provocar asociaciones moleculares y reducir la permeabilidad de membrana. La fijación en formalina es uno de los enfoques citológicos/histológicos más comunes. La formalina forma enlaces metilo entre proteínas adyacentes o dentro de proteínas. También se usa precipitación o coagulación para fijación y se usa frecuentemente etanol en este tipo de fijación. Puede usarse también una combinación de reticulación y precipitación para fijación. Un proceso de fijación fuerte es mejor en la conservación de información morfológica mientras que un proceso de fijación más débil es mejor en la conservación de dianas moleculares.

Un fijador representativo sería etanol absoluto al 50 %, polietilenglicol (PEG) 2 mM formaldehído 1,85 %. Las variaciones de esta formulación incluyen etanol (de 50 % a 95 %), metanol (20 %-50 %) y formalina (formaldehído) solamente. Otro fijador común es PEG 1500 2 %, etanol 50 % y metanol 3 %. Los portaobjetos se colocan en el fijador durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y después se retiran y se permite que se sequen. Una vez que se han fijado los portaobjetos estos pueden aclararse con una solución tamponada como PBS.

Puede usarse una amplia serie de colorantes para destacar diferencialmente y contraer o “teñir” características celulares, subcelulares y tisulares o estructuras morfológicas. Se usa hematoxilina para teñir los núcleos con un color azul o negro. El Orange G-6 y Eosin Azure tiñen ambos el citoplasma de la célula. El Orange G tiñe células que contienen queratina y glucógeno de amarillo. Eosin Y se usa para teñir los nucleolos, cilios, glóbulos rojos y células escamosas epiteliales superficiales. Se usan tinciones de Romanowsky para portaobjetos secados al aire y son útiles en la potenciación de pleomorfismo y distinción de material extracelular del intracitoplasmático.

El proceso de tinción puede implicar un tratamiento para aumentar la permeabilidad de las células a la tinción. Puede usarse el tratamiento de las células con un detergente para aumentar la permeabilidad. Para aumentar la permeabilidad celular y tisular pueden tratarse adicionalmente muestras fijadas con disolventes, saponinas o detergentes no iónicos. La digestión enzimática también puede mejorar la accesibilidad de dianas específicas en una muestra tisular.

Después de la tinción, la muestra se deshidrata usando una sucesión de aclarados con alcohol con concentración de alcohol creciente. El lavado final se realiza con xileno o un sustituto de xileno, tal como un terpeno de cítrico, que tiene un índice refractario cercano al del cubreobjetos para aplicar al portaobjetos. Esta etapa final se denomina eliminación. Una vez que la muestra se deshidrata y se elimina se aplica un medio de montaje. El medio de montaje se selecciona para tener un índice refractario cercano al del vidrio y es capaz de unir el cubreobjetos con el portaobjetos. También evitará el secado, encogimiento, o decoloración adicional de la muestra celular.

Independientemente de las tinciones o etapas de procesamiento usadas, la evaluación final del especímenes citológico se realiza por algún tipo de microscopía y una inspección visual de la morfología y determinación de la presencia o ausencia de marcador. Los métodos microscópicos utilizados incluyen campo claro, contraste de fases, fluorescencia y contraste de interferencia diferencial.

Si se requieren ensayos secundarios en la muestra después del examen, puede retirarse el cubreobjetos y destañarse el portaobjetos. La destinción implica usar los sistemas de disolventes originales usados en la tinción del portaobjetos originalmente sin el colorante añadido y en un orden inverso al procedimiento de tinción original. La destinción también puede completarse empapando el portaobjetos con un alcohol ácido hasta que las células son incoloras. Una vez que son incoloras, los portaobjetos se aclaran bien en un baño de agua y se aplica el segundo procedimiento de tinción.

Además, puede ser posible la diferenciación molecular específica junto con el análisis morfológico celular mediante el uso de reactivos moleculares específicos tales como anticuerpos o sondas de ácido nucleico. Esto mejora la precisión de la citología diagnóstica. Puede usarse microdissección para aislar un subconjunto de células para evaluación adicional, en particular, para evaluación genética de cromosomas anómalos, expresión génica o mutaciones.

En histología, pueden recogerse especímenes tisulares de tejidos epiteliales, conectivos, cartílago, hueso, músculo, nervios, vasos, corazón, sistema linfático, tracto respiratorio, tracto urinario, sistema endocrino y sistema reproductor.

La preparación de una muestra tisular para evaluación histológica implica fijación, deshidratación, infiltración, inclusión y sección. Los reactivos de fijación usados en histología son muy similares o idénticos a los usados en citología y tienen los mismos problemas de conservación de las características morfológicas a costa de las moleculares tales como proteínas individuales. Puede ahorrarse tiempo si la muestra tisular no se fija y se deshidrata sino que en su lugar se congela y después se secciona mientras está congelada. Esta es una etapa de procesamiento más suave y puede conservar más marcadores individuales. Sin embargo, la congelación no es aceptable para almacenamiento a largo plazo de una muestra tisular ya que se pierde información subcelular debido a la introducción de cristales de hielo. El hielo en la muestra tisular congelada también evita que el proceso de sección produzca un corte muy fino y por lo tanto puede perderse algo de resolución microscópica y captura de imágenes de estructuras subcelulares. Además de la fijación en formalina, se usa tetróxido de osmio para fijar y teñir fosfolípidos (membranas).

Se consigue deshidratación de tejidos con lavados sucesivos de concentración de alcohol creciente. El aclaramiento requiere un material que es miscible con alcohol y el material de inclusión implica un proceso por etapas comenzando a alcohol:reactivo de aclaramiento 50:50 y después agente de aclaramiento 100 % (xileno o sustituto de xileno). La infiltración implica incubar el tejido con una forma líquida del agente de inclusión (cera caliente, solución de nitrocelulosa) en primer lugar a agente de inclusión:agente de aclaramiento 50:50 y el agente de inclusión 100 %. La inclusión se completa colocando el tejido en un molde o casete y cargando con agente de inclusión fundido tal como cera, agar o gelatina. Se permite que el agente de inclusión se endurezca. La muestra tisular endurecida puede después cortarse en secciones finas para tinción y examen posterior.

Antes de la tinción, el corte de tejido se desparafina y se rehidrata. Se usa xileno para desparafinar la sección, pueden usarse uno o más cambios de xileno, y el tejido se rehidrata por lavados sucesivos en alcohol de concentración decreciente. Antes de la desparafinación, el corte de tejido puede inmovilizarse por calor en un portaobjetos de vidrio a 80 °C durante 20 minutos. Las tinciones de histología se enumeran en la Figura 1.

La microdissección de captura por láser permite el aislamiento de un subconjunto de células para análisis posterior de un corte de tejido.

Como en la citología, para potenciar la visualización de las características microscópicas, la sección o corte tisular puede teñirse con diversas tinciones. Está disponible un gran menú de tinciones para potenciar o identificar características específicas.

Para aumentar adicionalmente la interacción de reactivos inmunológicos con muestras citológicas/histológicas se han desarrollado varias técnicas para "recuperación de antígenos". La primera de dichas técnicas se basó en calentamiento a alta temperatura de una muestra fijada. Este método también se denomina recuperación de epítipo inducida por calor o HIER. Se han usado diversas técnicas de calentamiento, incluyendo calentamiento por vapor, microondas, autoclave, baños de agua y cocinado a presión o una combinación de estos métodos para calentar. Las soluciones de recuperación de antígenos incluyen agua, citrato o tampones de solución salina normales. La clave de la recuperación de antígenos es el tiempo a alta temperatura pero también se han usado con éxito temperaturas menores durante tiempos más largos. Otra clave para la recuperación de antígeno es el pH de la solución de calentamiento. Se ha descubierto que el pH bajo proporciona la mejor inmunotinción pero también da lugar a fondos que requieren el uso de un segundo corte de tejido como un control negativo. El beneficio más uniforme (inmunotinción aumentada sin aumento del fondo) se descubrió con una solución de pH alto independientemente de la composición de tampón. El proceso de recuperación de antígeno para una diana específica debería optimizarse empíricamente para esa diana usando calor, tiempo, pH y composición de tampón como variables para la optimización del proceso. El uso del método de recuperación de antígenos por microondas ha permitido tinción secuencial de diferentes dianas con reactivos de anticuerpo. No obstante también se ha mostrado que el tiempo requerido para complejos de anticuerpos y enzimas entre etapas de tinción degrada antígenos de membranas celulares. Los métodos de calentamiento por microondas tienen también métodos de hibridación in situ mejorados.

Para iniciar el proceso de recuperación de antígenos, la sección se desparafina en primer lugar y se hidrata. El portaobjetos se coloca después en tampón de citrato sódico 10 mM pH 6,0 en una placa o frasco. Un procedimiento representativo usa un microondas a 1100 W y calienta en microondas el portaobjetos a 100 % de potencia durante 2 minutos seguido de calentamiento por microondas de los portaobjetos usando 20 % de potencia durante 18 minutos después de comprobar para asegurar que el portaobjetos permanece cubierto de líquido. Después se permite que el portaobjetos se enfríe en el recipiente sin tapar y después se aclara con agua destilada. Puede usarse HIER en combinación con una digestión enzimática para mejorar la reactividad de la diana a reactivos inmunológicos.

Uno de dichos protocolos de digestión enzimática usa proteinasa K. Se prepara una concentración 20 µg/ml de proteinasa K en Base Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,5 %, tampón pH 8,0. El proceso implica en primer lugar desparafinar secciones en 2 cambios de xileno, 5 minutos cada uno. Después la muestra se hidrata en 2 cambios de etanol 100 % durante 3 minutos cada uno, etanol 95 % y 80 % durante 1 minuto cada uno y después se aclara en agua destilada. Las secciones se tapan con solución de trabajo de proteinasa K y se incuban durante 10-20 minutos a 37 °C en una cámara humidificada (el tiempo de incubación óptimo puede variar dependiendo del tipo tisular y el grado de fijación). Las secciones se enfrían a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se aclaran en PBS Tween 20 durante 2x2 min. Si se desea las secciones pueden bloquearse para eliminar la interferencia potencial de compuestos endógenos y enzimas. La sección se incuba después con anticuerpo primario a una dilución apropiada en tampón de dilución de anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. La sección se aclara después con PBS Tween 20 durante 2x2 min. Puede realizarse bloqueo adicional si se requiere para la aplicación específica seguido de aclarado adicional con PBS Tween 20 durante 3x2 min y finalmente después se completa el protocolo de inmunotinción.

5 Un tratamiento sencillo con SDS 1 % a temperatura ambiente también ha demostrado mejorar la tinción inmunohistoquímica. Se han aplicado métodos de recuperación de antígenos a secciones montadas en portaobjetos así como secciones que flotan libremente. Otra opción de tratamiento es colocar el portaobjetos en un frasco que contiene ácido cítrico y Nonident P40 0,1 a pH 6,0 y calentar a 95 °C. El portaobjetos se lava después con una solución de tampón como PBS.

Para tinción inmunológica de tejidos puede ser útil bloquear la asociación no específica del anticuerpo con proteínas tisulares empapando la sección en una solución de proteína como suero o leche en polvo desnatada.

10 Se entiende que una “muestra tratada con aptámero de velocidad de disociación lenta” significa cualquier portaobjetos citológico o histológico o sección que pueda tratarse con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta para una o más dianas para detectar. El proceso de tratamiento puede incluir colocar el portaobjetos o sección en uno o más tampones o reactivos en una o más temperaturas durante un periodo de tiempo suficiente para completar la interacción deseada entre el aptámero de velocidad de disociación lenta y la
15 diana, el aptámero de velocidad de disociación lenta y resto de detección posterior, división, reacciones del bloqueo u otras etapas de proceso.

Las reacciones de bloqueo pueden incluir la necesidad de reducir el nivel de biotina endógena; eliminar los efectos de carga endógena; inactivar las nucleasas endógenas; y/o inactivar las enzimas endógenas como peroxidasa y fosfatasa alcalina. Pueden inactivarse nucleasas endógenas mediante degradación con proteinasa K, por
20 tratamiento con calor, uso de un agente quelante tal como EDTA o EGTA, la introducción de ADN o ARN vehículo, tratamiento con un caótropro tal como urea, tiourea, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, perclorato de litio, etc., o dietil pirocarbonato. La fosfatasa alcalina puede inactivarse por tratamiento con HCl 0,1 N durante 5 minutos a temperatura ambiente o tratamiento con levamisol 1 mM. La actividad peroxidasa puede eliminarse por
25 tratamiento con peróxido de hidrógeno 0,03 %. La biotina endógena puede bloquearse empapando el portaobjetos o la sección en una solución de avidina (estreptavidina, neutravidina puede sustituirse) durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente. El portaobjetos o la sección se lavan después durante al menos 10 minutos en tampón. Esto puede repetirse al menos tres veces. Después, el portaobjetos o la sección se empapan en una solución de biotina durante 10 minutos. Esto puede repetirse al menos tres veces con una solución de biotina nueva cada vez. Se repite
30 el procedimiento de lavado con tampón. Todos los portaobjetos o secciones usados para un único fin de diagnóstico deberían tratarse con el mismo protocolo de bloqueo. Los protocolos de bloqueo deberían minimizarse para evitar el daño a la estructura celular o tisular o la diana o las dianas de interés pero uno o más de estos protocolos podrían combinarse para “bloquear” un portaobjetos o sección antes de la reacción con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta.

35 En una realización, una muestra citológica puede recogerse, aplicarse a un portaobjetos de vidrio, fijarse, teñirse con respecto a los elementos estructurales/morfológicos apropiados para la muestra recogida y patología para diagnosticar, examinarse microscópicamente y después puede hacerse reaccionar con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta para la diana o las dianas deseadas. El método puede incluir además una o más de las siguientes etapas: una etapa de recuperación de antígeno; tratamiento para aumentar la permeabilidad celular (permeabilización); una o más etapas de bloqueo; deshidratación; aclaramiento; etapas de lavado; y/o una etapa de
40 destinción. La secuencia de las etapas individuales puede intercambiarse según sea necesario. Los aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden diseñarse opcionalmente para reticular con su diana específica.

45 En una realización, una muestra citológica puede recogerse, aplicarse a un portaobjetos de vidrio, fijarse, teñirse con respecto a los elementos estructurales/morfológicos apropiados para la muestra recogida y patología para diagnosticar, examinarse microscópicamente, y después hacerse reaccionar con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta de reticulación o fotoaptámeros para la diana o las dianas deseadas. El método puede incluir además una o más de las siguientes etapas; una etapa de recuperación de antígeno; tratamiento para aumentar la permeabilidad celular (permeabilización); deshidratación; aclaramiento; una o más etapas de bloqueo; etapas de lavado; y/o una etapa de destinción. La secuencia de las etapas individuales puede intercambiarse según sea necesario, pero incluye una etapa adicional para activar el proceso de reticulación.
50

55 En otra realización pueden utilizarse secciones de un procedimiento de bloque celular. Cuando se usa un bloque celular la muestra puede prepararse como si fuera una muestra de tisular. Una sección puede teñirse según sea apropiado para el tipo celular y la patología para diagnosticar. Otra sección puede tratarse con el o los aptámeros de velocidad de disociación lenta para detección de diana o dianas específicas. Y otra sección puede tratarse con los mismos reactivos y secuencia que la sección tratada con aptámero de velocidad de disociación lenta en ausencia del o los aptámeros de velocidad de disociación lenta para actuar como una sección de control negativo.
60 Opcionalmente estos aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden reticularse con aptámeros de velocidad de disociación lenta o fotoaptámeros. Estos procedimientos pueden aplicarse a cortes de tejido.

65 En algunas realizaciones, una vez que se ha permitido que el aptámero o los aptámeros de velocidad de disociación lenta se equilibren con la muestra tisular celular para formar un complejo de afinidad de diana de aptámero de velocidad de disociación lenta, puede usarse una exposición cinética. Si se introduce una exposición cinética, es poco probable que los complejos no específicos entre el aptámero de velocidad de disociación lenta y cualquier

molécula no diana se reforme después de su disociación. Ya que los complejos no específicos generalmente se disocian más rápidamente que un complejo de afinidad de aptámeros de velocidad de disociación lenta, una exposición cinética reduce la probabilidad de que un aptámero de velocidad de disociación lenta esté implicado en un complejo no específico con una no diana. Una exposición cinética eficaz puede proporcionar al ensayo especificidad adicional, más allá de la del acontecimiento de unión de aptámero de velocidad de disociación lenta inicial y cualquier interacción covalente opcional posterior. Por lo tanto, la exposición cinética ofrece un segundo determinante de especificidad. En una realización, se añade sulfato de dextrano 10 mM a los complejos de afinidad de aptámeros de velocidad de disociación lenta que son asociados a tejido o célula, y se incuba durante aproximadamente 15 minutos. En otra realización, la exploración cinética se inicia en presencia de sulfato de dextrano 10 mM. En el caso de una exposición cinética que usa un competidor, el competidor también puede ser cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con un aptámero de velocidad de disociación lenta libre, por ejemplo, para evitar que el aptámero de velocidad de disociación lenta se vuelva a unir de forma no específica con una molécula no diana. Dichas moléculas competidoras incluyen policationes (por ejemplo, espermina, espermidina, polilisina y poliarginina) y aminoácidos (por ejemplo, arginina y lisina). Cuando se usa un competidor como la exposición cinética se utiliza una concentración bastante alta en relación con la concentración anticipada de proteína total o aptámero de velocidad de disociación lenta total presente en la muestra. En una realización, se usa sulfato de dextrano aproximadamente 10 mM como el competidor en una exposición cinética. En una realización, la exposición cinética comprende añadir un competidor a la muestra tisular o celular que contiene el complejo de afinidad de aptámeros de velocidad de disociación lenta, e incubar la muestra durante un tiempo de más de o igual a aproximadamente 30 segundos, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 60 minutos. En otra realización, la exploración cinética comprende añadir un competidor a la muestra tisular o celular que contiene el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta e incubar durante un tiempo tal que la relación del nivel medido de complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta con respecto al nivel medido del complejo no específico aumente.

En algunas realizaciones, la exposición cinética se realiza poniendo en contacto el especímenes con tampón de unión o cualquier otra solución que no aumente significativamente la velocidad de disociación natural de complejos de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta. La dilución puede ser aproximadamente 2x, aproximadamente 3x, aproximadamente 4x, aproximadamente 5x o cualquier dilución mayor adecuada. Las diluciones mayores proporcionan una exposición cinética más eficaz reduciendo la concentración de proteína total y aptámero de velocidad de disociación lenta después de la dilución y, por lo tanto, la velocidad de su reasociación. En una realización, el complejo de afinidad de aptámeros de velocidad de disociación lenta se diluye eficazmente mediante adición del diluyente y se incuba durante un tiempo \geq aproximadamente 30 segundos, \geq aproximadamente 1 minuto, \geq aproximadamente 2 minutos, \geq aproximadamente 3 minutos, \geq aproximadamente 4 minutos, \geq aproximadamente 5 minutos, \geq aproximadamente 10 minutos, \geq aproximadamente 30 minutos y \geq aproximadamente 60 minutos. En otra realización, el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta se diluye eficazmente mediante la adición de un diluyente y se incuba durante un tiempo tal que la relación del nivel medido de complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta con respecto al nivel medido del complejo no específico aumente.

En algunas realizaciones, la exposición cinética se realiza de tal manera que el efecto de la dilución de muestras y el efecto de introducir un competidor se realizan simultáneamente. Por ejemplo, una muestra tisular o celular puede diluirse eficazmente mediante la adición de un gran volumen de competidor. La combinación de estas dos estrategias de exposición cinética puede proporcionar una exposición cinética más eficaz de lo que puede conseguirse usando una estrategia. En una realización, la dilución eficaz puede ser de aproximadamente 2x, aproximadamente 3x, aproximadamente 4x, aproximadamente 5x, o cualquier dilución mayor adecuada y el competidor es sulfato de dextrano aproximadamente 10 mM. En una realización, el competidor es sulfato de dextrano aproximadamente 1 mM. En una realización, la exposición cinética comprende poner en contacto la muestra tisular o celular que contiene el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta con un volumen de diluyente, añadir un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta, e incubar la mezcla que contiene el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta durante un tiempo mayor de o igual a aproximadamente 30 segundos, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 60 minutos. En otra realización, la exposición cinética comprende diluir la mezcla que contiene el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta, añadir un competidor a la mezcla que contiene el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta e incubar la mezcla que contiene el complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta durante un tiempo tal que la relación del nivel medido de complejo de afinidad de aptámero de velocidad de disociación lenta con respecto al nivel medido del complejo no específico aumente. En una realización, la etapa de reticulación se introduce en el procedimiento después de la etapa de exposición cinética. En otra realización, la etapa de reticulación se introduce en el procedimiento después de una etapa de exposición cinética y una etapa de lavado.

65

En otra realización, una muestra del ensayo tisular se recoge, se congela o se fija, se deshidrata, se filtra con un medio de inclusión, se incluye en el medio de inclusión, se corta, se monta, se aclara, se tiñe con respecto a los elementos apropiados para la muestra recogida y la patología para diagnosticar, se examina microscópicamente y después se hace reaccionar con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta para la diana o las dianas
 5 deseadas. El método puede incluir además una o más de las siguientes etapas: una etapa de recuperación de antígeno; tratamiento para aumentar la permeabilidad tisular (permeabilización); una o más etapas de bloqueo; deshidratación; etapas de lavado; y/o una etapa de destinción. La secuencia de las etapas individuales puede intercambiarse según sea necesario. Todos los procesos hasta el primer examen microscópico pueden completarse en corte de tejido que flota libremente. Opcionalmente estos aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden ser
 10 aptámeros de velocidad de disociación lenta de reticulación o fotoaptámeros.

En otra realización se usan múltiples cortes de tejido en el procedimiento de diagnóstico. Una sección se tiñe y es apropiada para el tipo tisular y patología para diagnosticar para evaluación de las estructuras morfológicas y características del tejido. Otra sección se trata con el o los aptámeros de velocidad de disociación lenta para la
 15 detección de diana o dianas específicas en una solución tamponada. Y otra sección se trata con los mismos reactivos y secuencia que la sección tratada con aptámero de velocidad de disociación lenta en ausencia del o los aptámeros de velocidad de disociación lenta para actuar como una sección de control negativo donde la etapa de reacción de aptámero de velocidad de disociación lenta se reemplaza por tratamiento con la solución tamponada usada en la etapa de reacción de aptámero de velocidad de disociación lenta.
 20

En otra realización, el frotis montado en portaobjetos, bloque celular o corte de tejido puede tratarse para desparafinar la muestra y después puede rehidratarse antes de la tinción. La tinción seleccionada puede ser apropiada para la muestra y patología para diagnosticar. Antes de la evaluación microscópica, la muestra montada en portaobjetos puede taparse con un cubreobjetos. Cuando la evaluación microscópica de los elementos
 25 morfológicos o estructurales se ha completado, entonces puede retirarse el cubreobjetos y la muestra puede opcionalmente tratarse con un reactivo, tal como alcohol ácido, para desteñir la muestra. Si se usa un protocolo de destinción la muestra debería lavarse varias veces con agua desionizada. Para preparar la muestra para reacción con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta específicos de diana, puede usarse opcionalmente un protocolo de bloqueo. Una realización usa sulfato de dextrano (DexSO₄) u otro compuesto polianiónico como un agente de bloqueo. Otros materiales polianiónicos podrían incluir heparina, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón, ARNt, polidextrano, polímeros de fosfodiéster abásicos, dNTP y pirofosfato. En una realización la solución de aclarado de aptámero de velocidad de disociación lenta puede contener un material polianiónico como sulfato de dextrano. Puede usarse una solución tamponada de uno o más aptámeros de velocidad de disociación
 30 lenta a una concentración de 1-20 nM de cada aptámero de velocidad de disociación lenta. La solución de aptámero de velocidad de disociación lenta puede aplicarse a la muestra e incubarse a temperatura ambiente o 37 °C durante un periodo de tiempo seleccionado (empíricamente) para maximizar la reacción, o unión, con la diana o las dianas específicas de interés. Los tiempos de incubación pueden ser de hasta 18 horas. La solución de aptámero de velocidad de disociación lenta tamponada puede contener otros diversos materiales tales como un polinucleótido no específico para minimizar la interacción no específica del aptámero o los aptámeros de velocidad de disociación
 35 lenta con sitios de unión a ácido nucleico en o sobre la muestra tisular o celular. La solución de aptámero de velocidad de disociación lenta tamponada puede después aclararse a partir de la muestra usando una solución de aclarado de aptámero de velocidad de disociación lenta. El cubreobjetos puede volver a aplicarse y la muestra examinarse microscópicamente para la detección de uno o más restos detectables específicos que pueden introducirse en la muestra mediante el aptámero de velocidad de disociación lenta.
 40
 45

En otra realización, el resto detectable introducido en la muestra mediante la unión del aptámero de velocidad de disociación lenta puede ser un fluorescente, quimioluminiscente, o resto detectable colorimétrico que se une directamente con el aptámero de velocidad de disociación lenta. Cuando se usan más de una aptámero de velocidad de disociación lenta en la solución de aptámero de velocidad de disociación lenta tamponada, cada aptámero de
 50 velocidad de disociación lenta puede incluir un resto detectable con una longitud de onda única de detección y/o excitación. Por lo tanto pueden detectarse simultáneamente múltiples dianas. Opcionalmente estos aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden diseñarse para reticular con su diana específica.

En otras realizaciones, las dianas pueden detectarse secuencialmente. En esta realización, una vez que se ha completado la evaluación morfológica con una tinción tradicional, la muestra puede hacerse reaccionar con un primer aptámero de velocidad de disociación lenta para una primera diana específica y el primer resto detectable puede introducirse por la presencia del primer aptámero de velocidad de disociación lenta si la primera diana
 55 específica está presente en la muestra. Después la muestra puede tratarse con condiciones de calor, tampón, pH, fuerza iónica suficientes para provocar que el par de primer aptámero de velocidad de disociación lenta/primer diana se disocie. El primer aptámero de velocidad de disociación lenta puede después lavarse de la muestra y hacerse reaccionar un segundo aptámero de velocidad de disociación lenta específico para una segunda diana con la muestra. El segundo resto detectable puede después detectarse si la segunda diana está presente en la muestra. Este ciclo puede completarse hasta que se han evaluado todas las dianas deseadas.
 60

En otra realización, el aptámero de velocidad de disociación lenta o aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden diseñarse con un elemento para soportar la generación de señal. En una realización, el elemento para
 65

soportar la generación de señal puede ser una enzima unida al aptámero de velocidad de disociación lenta, o unirse mediante un marcador, de modo que no interfiera con la unión del aptámero de velocidad de disociación lenta con la diana. Una vez que el aptámero de velocidad de disociación lenta se ha unido con la diana específica y se ha retirado el exceso de aptámero de velocidad de disociación lenta, o aptámeros de velocidad de disociación lenta, la enzima puede hacerse reaccionar con su sustrato específico para producir una señal detectable en el sitio en el que puede inmovilizarse la enzima. Puede usarse un sustrato precipitante, colorimétrico o fluorescente. En otra realización, la enzima unida al aptámero de velocidad de disociación lenta puede usarse para aumentar la señal. En otra realización, el elemento para soportar la generación de señal consiste en dos componentes. El primer componente del elemento para soportar la generación de señal se diseña en el aptámero de velocidad de disociación lenta y es ligando como biotina que reacciona con un receptor correspondiente como avidina, el segundo componente del elemento para soportar la generación de señal. El segundo componente puede unirse con el resto detectable.

En otra realización, el aptámero de velocidad de disociación lenta que ha reaccionado con una diana específica en la muestra puede usarse en combinación o actuar como la diana del ácido nucleico en diversos métodos de amplificación de ácido nucleico incluyendo PCR, amplificación por círculo rodante, q-beta replicasa, desplazamiento de cadena, amplificación dependiente de helicasa, amplificación isotérmica mediada por bucle, reacción en cadena de la ligasa, amplificación por círculo rodante asistida por restricción y circularización, etc. Por ejemplo, el aptámero de velocidad de disociación lenta inmovilizado en diana puede actuar como un molde para que una reacción de PCR produzca múltiples copias de un producto de PCR en una solución que cubre la muestra. La detección del producto de PCR podría completarse por una amplia diversidad de métodos por hibridación de un producto de PCR marcado con una matriz, por medición de PCR en tiempo real, por electroforesis en gel, métodos de secuenciación, etc.

En otra realización, la muestra tisular o celular se hace reaccionar con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta antes de cualquier procedimiento de tinción morfológica.

Una realización para el uso de aptámeros de velocidad de disociación lenta en una evaluación citológica sería la combinación de una evaluación de frotis de PAP con aptámeros de velocidad de disociación lenta específicos para dianas moleculares de las cepas de HPV16 y/o 18 de alto riesgo. En este caso los aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden diseñarse para reaccionar con proteínas E6 o E7 o con E6 o E7 y una de las proteínas L1 o E2 o L2. Un protocolo de tinción de frotis de PAP representativo utiliza una combinación de colorantes, hematoxilina de Harris, orange G6 y EA 50. EA 50 es un colorante de combinación que contiene eosin Y, Bismarck brown y fast green. La hematoxilina tiñe los núcleos azules, los otros colorantes reaccionan con queratina para tefir el citoplasma celular de verde a azul o rosa dependiendo del contenido de queratina. El protocolo de tinción puede iniciarse con la hematoxilina (5 minutos). Cada etapa de tinción puede seguirse de varios lavados (por ejemplo 3) antes de la siguiente etapa. Los ciclos de lavado pueden eliminarse después de la etapa de tratamiento con alcohol. El portaobjetos puede tratarse con solución HCl 0,1 % durante 1 minuto, después con agua de amoníaco al 0,02 % durante 1 minuto, etanol de uso en reactivos 95 % durante 2 minutos para 2 ciclos, Orange G6 durante 2 minutos, etanol de uso en reactivos 95 % durante 2 minutos y 2 ciclos, EA 50 durante 3 minutos y finalmente etanol de uso en reactivos 95 % durante 2 minutos y 2 ciclos. Los portaobjetos pueden deshidratarse con alcohol y aclararse con xileno y después aplicarse un medio de montaje y puede aplicarse un cubreobjetos. Los portaobjetos pueden después examinarse microscópicamente. El cubreobjetos puede después retirarse y el portaobjetos puede tratarse con uno o más aclarados de alcohol ácido para retirar los colorantes usados para el examen morfológico. Una vez que el frotis se ha desteñido, el cubreobjetos puede cubrirse con una solución de reacción que contiene el aptámero de velocidad de disociación lenta (o aptámeros de velocidad de disociación lenta) e incubarse desde 30 minutos a una noche. El periodo de incubación debería seleccionarse para utilizar la asociación de aptámeros de velocidad de disociación lenta con su diana específica minimizando al mismo tiempo la tinción de fondo.

Una solución de reacción o tamponada podría contener independientemente 0,005-40 nM de uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta cada uno específico de una diana de interés. Por ejemplo, la concentración de aptámero de velocidad de disociación lenta podría ser \leq cualquiera de las siguientes concentraciones: 0,005 nM, 1 nM, 2 nM, 4 nM, 8 nM, 16 nM, 32 nM, 35 nM o 40 nM por aptámero de velocidad de disociación lenta en la mezcla. La solución de reacción podría contener un tampón tal como SB 17 (HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, TWEEN-20 0,05 %) u otro tampón seleccionado anteriormente para minimizar los cambios de células o tejidos o promover la difusión de aptámero de velocidad de disociación lenta a la sección (tisular o celular). La solución de reacción puede contener además materiales para minimizar la unión no específica del aptámero de velocidad de disociación lenta a ácidos nucleicos derivados de la muestra incluyendo por ejemplo ADN de esperma de arenque, etc. Los componentes adicionales podrían incluir sulfato de dextrano, una proteína vehículo como caseína, etc. Podría utilizarse una etapa de exposición cinética opcional.

En una realización, pueden usarse cortes de tejido o células de varios tipos tumorales relacionados, para seleccionar y producir aptámeros de velocidad de disociación lenta que reaccionan con un marcador tumoral deseado. Debido a que el marcador en los diferentes cortes de tejido puede reticularse o asociarse con diferentes materiales en los diferentes cortes de tejido puede ser posible seleccionar y producir aptámeros de velocidad de disociación lenta que diferencian la presencia de ese marcador particular en el ambiente específico, localizado, que es único de ese tipo tumoral. Por lo tanto puede ser posible identificar un panel de aptámeros de velocidad de disociación lenta que

pueden usarse para diferenciar, por ejemplo, oligodendroglioma anaplásico, astrocitomas y oligoastrocitomas. Opcionalmente esos aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden ser fotoaptámeros o aptámeros de reticulación.

5 En otra realización, los aptámeros de velocidad de disociación lenta seleccionados y producidos para diferenciar tipos tumorales, pueden reducirse de modo que cada aptámero de velocidad de disociación lenta en una mezcla de reacción contenga un fluorescente único u otro tipo de etiqueta que produciría una señal específica única de ese aptámero de velocidad de disociación lenta. Podría usarse detección de una combinación única de etiquetas para proporcionar la diferenciación del tipo de tumor. Cada aptámero de velocidad de disociación lenta podría también
10 producirse con múltiples copias del fluorescente u otra etiqueta para aumentar la señal generada tras interacción del aptámero de velocidad de disociación lenta y su diana específica en un corte de tejido o preparación celular. Pueden seleccionarse etiquetas generadoras de señal para que estén claramente visibles en células teñidas o tejidos lo que elimina la necesidad de desteñir la muestra antes de reacción con el aptámero de velocidad de disociación lenta o aptámeros de velocidad de disociación lenta. Opcionalmente estos aptámeros de velocidad de disociación lenta
15 pueden ser fotoaptámeros o aptámeros de reticulación.

En otra realización, el corte de tejido o las células pueden reaccionar con aptámeros de velocidad de disociación lenta seleccionados y producidos para un marcador tumoral específico. Además del aptámero de velocidad de disociación lenta o aptámeros de velocidad de disociación lenta para el marcador tumoral, el corte de tejido o las
20 células pueden reaccionar con un o más aptámeros de velocidad de disociación lenta que son específicos de una o más hormonas u otro tipo de marcador específico de tumor que pueden producirse por el tumor y ayudan a identificar el tipo y origen del tumor.

En otra realización, el corte de tejido o las células pueden hacerse reaccionar con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta seleccionados y producidos para uno o más marcadores que pueden usarse para establecer el pronóstico de la enfermedad. En una realización, el corte de tejido o las células pueden hacerse reaccionar con uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta seleccionados y producidos para uno o más marcadores que pueden usarse para soportar la selección de agentes terapéuticos apropiados. Por ejemplo, la presencia de un alto nivel de una glucosil hidrolasa específica, YKL-40, en un glioma puede indicar un pronóstico
25 peor que en un glioma que tiene menos YKL-40. La expresión diferencial del nivel de YKL-40 puede establecerse por el nivel de tinción de aptámero de velocidad de disociación lenta observado en el corte de tejido o en la preparación celular en relación con un material de control.

En cualquiera de las realizaciones para el análisis de una muestra tisular o celular, después de la incubación inicial del o de los aptámeros de velocidad de disociación lenta con la muestra, el aptámero de velocidad de disociación lenta o aptámeros de velocidad de disociación lenta pueden reticularse opcionalmente con sus dianas correspondientes por exposición al activador de reticulación apropiado.
35

En otra realización, se proporciona un reactivo histológico o citológico que puede consistir en uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta específicos para una o más dianas que son indicativas de una patología específica. Las dianas pueden incluir marcadores específicos tumorales, hormonas u otras moléculas. Además de los aptámeros de velocidad de disociación lenta, el reactivo puede consistir en tampones, sales, detergentes, reactivos de bloqueo, competidores y estabilizadores.
40

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a kits útiles para realizar convenientemente cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento para analizar especímenes. Para potenciar la versatilidad de los métodos desvelados, los reactivos pueden proporcionarse en combinación envasada, en el mismo recipiente o recipientes separados, de modo que la relación de los reactivos posibilita la optimización sustancial del método y el ensayo. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y estabilidad de los reactivos.
45
50

Un kit comprende, en combinación envasada, al menos un aptámero y al menos un competidor para reducir la unión no específica. El kit también puede incluir soluciones de lavado tales como medio acuoso tamponado para dilución de muestras así como lavado de portaobjetos, reactivos de preparación de muestras y así sucesivamente. Además el kit puede contener reactivos adecuados para realizar la exposición cinética deseada durante el método analítico. Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits puede variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que es necesario que se produzcan durante el ensayo y para optimizar además sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit puede proporcionarse como un polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, que tras la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método de ensayo de acuerdo con la presente divulgación. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método de acuerdo con cualquiera de los métodos como se describe en el presente documento.
55
60

En una realización, un kit para la detección y/o cuantificación de una o más dianas que pueden estar presentes en un espécimen incluye al menos un aptámero que tiene afinidad específica por una diana, y al menos un competidor polianiónico para reducir la unión no específica.

5 En otra realización, un kit para la detección y/o cuantificación de una o más dianas que pueden estar presentes en un espécimen incluye al menos un aptámero que tiene afinidad específica por una diana que tiene un resto de detección/etiqueta unido covalentemente, y al menos un competidor polianiónico para reducir la unión no específica.

10 En otra realización, un kit para la detección y/o cuantificación de una o más dianas que puede estar presente en un espécimen incluye al menos un aptámero que tiene afinidad específica por una diana y un resto covalente que puede teñirse por un reactivo de tinción secundario, y al menos un competidor polianiónico para reducir la unión no específica.

15 Además, cualquiera de los kits descritos anteriormente puede contener reactivos y materiales para la realización de una exposición cinética durante el método de detección del kit.

El método de la presente divulgación se ilustra en general en los Ejemplos 1-11. El Ejemplo 1 describe el método de SELEX de afinidad general usando una mezcla candidata comprendida por nucleótidos modificados. El Ejemplo 2 describe un método de photoSELEX que usa una mezcla candidata comprendida por nucleótidos modificados y un grupo fotorreactivo 5' terminal y el método de SELEX mejorado en el que se usa dilución para proporcionar el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta a la mezcla de aptámero:diana equilibrada. El Ejemplo 3 extiende el método descrito en el Ejemplo 2 por 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 semivida de disociación promedio ($t_{1/2}$) para aptámeros usando los nucleótidos modificados 5-(N-bencilcarboxiamida)-dUTP (BndUTP), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-dUTP (iBudUTP), o 5-(N-triptaminocarboxiamida)-dUTP (TrpdUTP) seleccionados en ausencia de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de 20 minutos teniendo algunos aptámeros un valor de $t_{1/2}$ de hasta una hora. Este es sustancialmente más largo que el que se ha descrito previamente con bases naturales u otros nucleótidos modificados. El promedio para aptámeros seleccionados con un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de más de 85 minutos. Más específicamente, en referencia a la Figura 4B, puede verse que la introducción de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta produjo aptámeros con valores de $t_{1/2}$ de \geq aproximadamente 15 min, \geq aproximadamente 30 min, \geq aproximadamente 60 min, \geq aproximadamente 90 min, \geq aproximadamente 120 min, \geq aproximadamente 150 min, \geq aproximadamente 180 min, \geq aproximadamente 210 min y \geq aproximadamente 240 min. Estas velocidades de disociación para complejos de aptámeros: diana no tienen anteriores.

35 El Ejemplo 5 describe la generación de aptámeros de velocidad de disociación lenta usando una mezcla candidata de NapdU (5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-dU).

40 El Ejemplo 6 describe la generación de un aptámero de velocidad de disociación lenta para una diana peptídica.

El Ejemplo 7 ilustra la utilidad de aptámeros de velocidad de disociación lenta en relación con aptámeros convencionales.

45 El Ejemplo 8 ilustra la generación de aptámeros de velocidad de disociación lenta usando una mezcla candidata de BndU.

El Ejemplo 9 describe la generación y aplicaciones histológicas de aptámeros de BndU de velocidad de disociación lenta para Her2 (ErbB- 2).

50 El Ejemplo 10 describe la generación y aplicaciones histológicas de aptámeros de BndU de velocidad de disociación lenta al receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB-1).

El Ejemplo 11 describe la generación y aplicaciones histológicas de aptámeros de BndU de velocidad de disociación lenta para antígeno específico de próstata (PSA).

55

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente para fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

60

EJEMPLO 1. La incorporación de nucleótidos modificados en bibliotecas de ácido nucleico conduce a bibliotecas enriquecidas de mayor afinidad en SELEX de afinidad

A. Preparación de mezclas candidatas

5 Se prepararon mezclas candidatas con dATP, dGTP, 5-metil-dCTP (MedCTP) y dTTP o uno de tres análogos de dUTP: 5-(N-bencilcarboxiamida)-dUTP (BndUTP), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-dUTP (iBudUTP) o 5-(N-triptaminocarboxiamida)-dUTP (TrpdUTP). Se prepararon mezclas candidatas por extensión por polimerasa de un cebador hibridado con un molde biotinilado (FIG. 3). Para cada composición de mezcla candidata, se combinaron
10 4,8 nmol de cebador de PCR directo y 4 nmol de molde en 100 µl de tampón de ADN polimerasa IX KOD (Novagen), se calentaron a 95 °C durante 8 minutos y se enfriaron en hielo. Cada mezcla de 100 µl de cebador:molde se añadió a una reacción de extensión de 400 µl que contenía tampón de ADN polimerasa KOD 1X, ADN polimerasa KOD XL 0,125 U/µl y 0,5 mM de cada uno de dATP, MedCTP, dGTP y dTTP o análogo de dUTP, y se incubó a 70 °C durante 30 minutos. Se capturó producto bicatenario mediante las biotinas de cadena molde añadiendo 1 ml de perlas magnéticas cubiertas con estreptavidina (Estreptavidina MagnaBind, Pierce, 5 mg/ml en NaCl 1 M + TWEEN-20 0,05 %) e incubando a 25 °C durante 10 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron tres veces con 0,75 ml de tampón SB1T (HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, TWEEN-20 0,05 %). La cadena de aptámero se eluyó de las perlas con 1,2 ml de NaOH 20 mM, se neutralizó con 0,3 ml de HCl 80 mM y se tamponó con 15 µl de HEPES 1 M, pH 7,5. Las mezclas candidatas se concentraron con un Centricon-30 a
20 aproximadamente 0,2 ml, y se cuantificaron por espectroscopia de absorbancia de UV.

B. Inmovilización de proteínas diana

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

C. Esquema de selección de aptámeros

35 Se realizaron selecciones de afinidad por separado con cada mezcla candidata, comparando la unión entre las perlas de proteínas diana (señal, S) y perlas (His)₆ (fondo, B). Para cada muestra, se preparó una mezcla de ADN candidata 0,5 µM en 40 µl de SB1T. Se añadió 1 µl de (His)₆-complemento oligo (1 mM) (FIG. 3) al ADN, junto con 10 µl de una mezcla competidora proteica (HSA 0,1 %, caseína 10 µM y protrombina 10 µM en SB1T).

40 Se realizaron reacciones de unión añadiendo 50 µl de perlas recubiertas con proteína diana o perlas recubiertas con (His)₆ (5 mg/ml en SB1T) a la mezcla de ADN e incubando a 37 °C durante 15 minutos con mezclado. La solución de ADN se retiró y las perlas se lavaron 5 veces a 37 °C con SB1T que contenía ADN de esperma de arenque 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich). A no ser que se indique, todos los lavados se realizaron resuspendiendo las perlas en 100 µl de solución de lavado, mezclando durante 30 segundos, separando las perlas con un imán y retirando la
45 solución de lavado. Los aptámeros unidos se eluyeron de las perlas añadiendo 100 µl de SB1T + guanidina-HCl 2 M e incubando a 37 °C durante 5 minutos con mezclado. El eluato del aptámero se transfirió a un nuevo tubo después de separación magnética. Después de los dos primeros ciclos de selección, los dos últimos de cinco lavados de perlas diana se realizaron durante 5 minutos en lugar de 30 segundos.

50 Las perlas con cebadores se prepararon inmovilizando cebador de PCR inversa biotinilado y perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (MyOne-Estreptavidina Cl (perlas SA), Invitrogen). Se lavaron 5 ml de perlas SA (10 mg/ml) una vez con NaCIT (NaCl 5 M, TWEEN-20 0,01 %) y se resuspendieron en 5 ml de cebador de PCR inverso biotinilado (5 µM en NaCIT). La muestra se incubó a 25 °C durante 15 minutos, se lavó dos veces con 5 ml de NaCIT, se resuspendió en 12,5 ml de NaCIT (4 mg/ml) y se almacenó a 4 °C.

55 Se añadieron 25 µl de perlas de cebadores (4 mg/ml en NaCIT) a los 100 µl de solución de aptámero en tampón de guanidina y se incubaron a 50 °C durante 15 minutos con mezclado. La solución de aptámero se retiró, y las perlas se lavaron 5 veces con SB1T. El aptámero se eluyó de las perlas añadiendo 85 µl de NaOH 20 mM e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 µl de eluato de aptámero a un nuevo tubo después de separación magnética, se neutralizó con 20 µl de HCl 80 mM y se tamponó con 1 µl de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5.
60

D. Amplificación y purificación de aptámeros

65 Se amplificó ADN de aptámero seleccionado y se cuantificó por QPCR. Se añadieron 48 µl de ADN a 12 µl de mezcla de QPCR (tampón de ADN polimerasa KOD 5X, MgCl₂ 25 mM, cebador de PCR directo 10 µM, cebador de PCR inverso biotinilado 10 µM, SYBR Green I 5X, ADN polimerasa KOD XL 0,125 U/µl y 1 mM de cada uno de

dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y se sometió a termociclador en un instrumento QPCR ABI5700 con el 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. Se realizó cuantificación con el software del instrumento y el número de copias de ADN seleccionado con perlas diana y perlas (His)₆ se comparó para determinar las relaciones de señal/fondo.

5 Después de la amplificación, el producto de PCR se capturó en perlas SA mediante la cadena antisentido biotilada. Se lavaron 1,25 ml de perlas SA (10 mg/ml) dos veces con 0,5 ml de NaOH 20 mM, una vez con 0,5 ml de SB1T, se resuspendieron en 2,5 ml de NaCl 3 M y se almacenaron a 4 °C. Se añadieron 25 µl de perlas SA (4 mg/ml en NaCl 3 M) a 50 µl de producto de QPCR bicatenario y se incubó a 25 °C durante 5 minutos con mezclado. Las perlas se
10 lavaron una vez con SB1T, y la cadena "con sentido" se eluyó de las perlas añadiendo 200 µl de NaOH 20 mM e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. La cadena eluida se descartó y las perlas se lavaron 3 veces con SB1T y una vez con NaCl 16 mM.

15 Se preparó cadena con sentido de aptámero con la composición de nucleótidos apropiada por extensión de cebadores de la cadena antisentido inmovilizada. Las perlas se resuspendieron en 20 µl de mezcla de reacción de extensión de cebadores (tampón de extensión de cebadores 1X (Tris-HCl 120 mM, pH 7,8 a 20, KCl 10 mM, MgSO₄ 7 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, BSA 0,001 % y Triton X100 0,01 %), cebador de PCR directo 5 µM, ADN polimerasa KOD XL 0,125 U/µl, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP o análogo de dUTP) y se incubó a 68 °C durante 30 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron 3 veces con SB1T, y la cadena de aptámero se eluyó de
20 las perlas añadiendo 85 µl de NaOH 20 mM, e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 µl de eluato del aptámero 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, pH 7,5.

25 E. Rigurosidad y retroalimentación de selección

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

$$30 \quad \text{Si } S/B < 10, [P](i + 1) = [P]i$$

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

$$\text{Si } SB \geq 100, [P](i + 1) = [P]i / 10$$

35 donde [P] = concentración de proteína e i = número de ciclo actual.

La concentración de proteína diana se redujo ajustando la masa de perlas de proteínas diana (y perlas de (His)₆ para determinación de fondo) añadida a la etapa de selección.

40 Después de cada ciclo de selección, se determinó el estado de convergencia de la mezcla de ADN enriquecida. Se diluyeron 5 µl de producto de QPCR bicatenario a 200 µl con MgCl₂ 4 mM que contenía SYBR Green I 1X. Las muestras se superpusieron con 75 µl de aceite de silicio y se analizaron con respecto a convergencia usando un análisis Cot que mide el tiempo de hibridación para mezclas complejas de oligonucleótidos bicatenarios. La muestra se sometió a termociclador con el siguiente protocolo: 3 ciclos de 98 °C, 1 minuto, 85 °C, 1 minuto; 1 ciclo de 93 °C,
45 1 minuto, 85 °C, 15 minutos. Durante los 15 minutos a 85 °C, las imágenes fluorescentes se midieron a intervalos de 5 segundos. La intensidad de fluorescencia se representó como una función del logaritmo (tiempo) para evaluar la diversidad de las secuencias.

50 F. Medición de la constante de unión en equilibrio (Kd)

Se midieron las constantes de unión en equilibrio de las bibliotecas enriquecidas usando división de perlas TALON. El ADN se renaturalizó calentando a 95 °C y enfriando rápidamente a 37 °C. Se formaron complejos mezclando una baja concentración de ADN radiomarcado (~1x10⁻¹¹ M) con una serie de concentraciones de proteína diana (1x10⁻⁷ M a 1x10⁻¹² M final) en tampón SB1, e incubando a 37 °C. Se transfirió una parte de cada reacción a una
55 membrana de nylon y se secó para determinar los recuentos totales en cada reacción. Se añadió una cantidad pequeña de perlas TALON 5 mg/ml al resto de cada reacción y se mezcló a 37 °C durante un minuto. Se pasó una parte a través de una Placa MultiScreen HV (Millipore) al vacío para separar complejos unidos a proteína de ADN no unido y se lavó con 100 µl de Tampón SB1. Se capturaron imágenes fosfoestimuladas de membranas de nylon y placas MultiScreen HV y se cuantificó la cantidad de radiactividad en cada muestra usando un FUJI FLA-3000. La
60 fracción de ADN capturado se representó en 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 Kd) de los datos. La Tabla 1 muestra los valores de K_d determinados para cada mezcla candidata enriquecida para un conjunto de dianas. NT indica que la biblioteca enriquecida para una composición de base particular no parecía haber cambiado desde la mezcla candidata original, como se determinó por análisis de Cot, y fue por tanto no ensayada (NE).

65

La Tabla 1 muestra las constantes de unión en equilibrio (K_d) para grupos enriquecidos con hasta quince dianas proteicas diferentes y cuatro bibliotecas de ADN diferentes: bases de origen natural (dT), 5-(N-bencilcarboxamida) (BndU), 5-(N-isobutilcarboxamida) (iBudU) o 5-(N-triptaminocarboxamida) (TrpdU). El uso de bases modificadas en el proceso de SELEX produce un porcentaje significativamente mayor de aptámeros de alta afinidad deseables. Se observó que solamente 2 de los 14 aptámeros producidos con los nucleótidos normales tenían las velocidades de disociación lentas deseadas. Se identificaron aptámeros de velocidad de disociación lentas producidos con los nucleótidos modificados 9 de 14, 7 de 14 y 14 de 14 para BndUTP, iBudUTP y TrpdUTP, respectivamente.

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

Proteína Diana	dTTP	BndUTP	iBudUTP	TrpdUTP
4-1BB	$>1,0 \times 10^{-7}$	$5,6 \times 10^{-9}$	$>1,0 \times 10^{-7}$	$3,9 \times 10^{-9}$
B7	$>1,0 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-8}$	NE	$7,2 \times 10^{-9}$
B7-2	$>1,0 \times 10^{-7}$	NE	$>1,0 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-9}$
CTLA-4	$>1,0 \times 10^{-7}$	NE	NE	$1,4 \times 10^{-9}$
E-Selectina	$>1,0 \times 10^{-7}$	$>1,0 \times 10^{-7}$	$>1,0 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-9}$
Fractalquina	NE	$>1,0 \times 10^{-7}$	NE	$5,1 \times 10^{-11}$
Proteína GA733-1	$8,9 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^{-9}$	$4,7 \times 10^{-9}$	$4,5 \times 10^{-10}$
Gp130	$>1,0 \times 10^{-7}$	$5,9 \times 10^{-9}$	$2,2 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-9}$
HMG-1	$>1,0 \times 10^{-7}$	NE	$2,2 \times 10^{-8}$	$4,9 \times 10^{-9}$
IR	$>1,0 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-10}$
OPG	$>3,7 \times 10^{-8}$	$4,6 \times 10^{-9}$	$9,5 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^{-10}$
PAI-1	$>1,0 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^{-10}$	$9,1 \times 10^{-10}$	$4,3 \times 10^{-10}$
P-Cadherina	$>1,0 \times 10^{-7}$	$3,5 \times 10^{-9}$	$5,2 \times 10^{-9}$	$2,7 \times 10^{-9}$
sLeptina R	$>1,0 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-9}$	NE	$4,6 \times 10^{-10}$

EJEMPLO 2. Generación de fotoaptámeros usando PhotoSELEX 5'-fija y proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta por dilución

15 A. Preparación de mezclas candidatas

Se prepararon mezclas candidatas que contenían dATP, dCTP, dGTP y BndUTP por extensión de polimerasa de un cebador hibridado con un molde biotinilado (Figura 5A-B). Para cada molde, se usaron cuatro cebadores directos diferentes, poseyendo cada uno un cromóforo único en el extremo 5' terminal (véase Figura 6 para las estructuras de cromóforo). Para cada mezcla candidata, se combinaron 11 nmol de cebador directo (con cromóforo 5') y 10 nmol de molde en 250 μ l de tampón de extensión de cebadores (Tris-HCl 120 mM, pH 7,8, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 mM, MgSO_4 7 mM, BSA 0,1 mg/ml, Triton X-100 0,1 %), se calentó a 95 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. Se añadieron 125 μ l de cada mezcla de cebador:molde a 1 ml de reacción de extensión que contenía tampón de extensión de cebadores, ADN polimerasa KOD XL 0,125 U/ μ l y 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y BndUTP y se incubó a 70 °C durante 30 minutos. Cada 1 ml de reacción se dividió en cuatro alícuotas de 250 μ l y se enfrió en hielo. Se capturó producto bicatenario mediante las biotinas de cadena molde añadiendo 1 ml de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (MagnaBind-Estreptavidina, Pierce, 5 mg/ml en NaCl 1M + TWEEN-20 0,05 %) a cada 250 μ l de alícuota e incubando a 25 °C durante 60 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron tres veces con 0,5 ml de tampón SB17T (HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, TWEEN-20 0,05 %). La cadena de aptámero se eluyó de las perlas con 1 ml de NaOH 20 mM, se neutralizó con 0,25 ml de HCl 80 mM y se tamponó con 10 μ l de HEPES 1 M, pH 7,5. Las mezclas candidatas se concentraron con un Centricon-30 hasta aproximadamente 0,2 ml, y se cuantificaron por espectroscopia de absorbancia de UV.

35 B. Preparación de proteínas diana

Se biotinilaron proteínas diana no marcadas mediante acoplamiento covalente de NHS-PEO4-biotina (Pierce) a restos de lisina. Se intercambiaron proteínas (300 pmoles en 50 μ l) a SB17T con una columna de microcentrifuga Sephadex G-25. Se añadió NHS-PEO4-biotina a 1,5 mM y la reacción se incubó a 4 °C durante 16 horas. Se retiró NHS-PEO4-biotina no reaccionado con una columna de microcentrifugación Sephadex G-25.

C. Selección de aptámeros con proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotorreticulación

Se realizaron selecciones por separado con cada mezcla candidata, comparando la unión entre muestras con proteína diana (señal S) y muestras sin proteína diana (fondo B). Los tres primeros ciclos se realizaron con selección de afinidad (sin fotorreticulación); el segundo y tercero incluyeron proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta. Los ciclos cuatro a ocho incluyeron tanto proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta como fotorreticulación.

Para cada muestra, se preparó una mezcla de ADN de 90 μ l en SB 17T con 10-20 pmoles de mezcla candidata (100 pmoles en el primer ciclo) y 100 pmoles de cebador inverso. Las muestras se calentaron hasta 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 μ l de mezcla competidora de proteínas (HSA 0,1 %, caseína 10 μ M, y protrombina 10 μ M en SB17T), se añadieron a 0,5 mg de perlas SA (prelavadas dos veces con NaOH 20 mM y una vez con SB 17T) y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos con mezclado. Las perlas se retiraron por separación magnética.

Se realizaron reacciones de unión añadiendo 10 μ l de proteína diana (0,5 μ M en SB17T) o SB 17T a 40 μ l de mezcla de ADN e incubando a 37 °C durante 30 minutos.

Cuando se empleó proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta, las muestras se diluyeron 20X añadiendo 950 μ l de SB 17T (precalentado a 37 °C) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos antes de capturar complejos.

Los complejos se capturaron en perlas SA mediante biotinas proteicas añadiendo 0,25 mg de perlas MyOne-SA (Invitrogen) e incubando a 37 °C durante 15 minutos con mezclado. Se retiró el ADN libre lavando las perlas cinco veces con SB17T. A no ser que se indique, todos los lavados se realizaron resuspendiendo las perlas en 100 μ l de solución de lavado, mezclando durante 30 segundos a 25 °C, separando las perlas con un imán y retirando la solución de lavado. La cadena de aptámero se eluyó de las perlas añadiendo 85 μ l de NaOH 20 mM, e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 μ l de eluato de aptámero a un nuevo tubo después de separación magnética, se neutralizó con 20 μ l de HCl 80 mM y se tamponó con 1 μ l de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5.

Cuando se empleó la fotoselección, las reacciones de unión de 50 μ l (o reacción de unión de 1 ml después de proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta opcional por dilución) se irradiaron desde arriba con una lámpara de mercurio de alta presión (Optical Associates, Inc. Modelo 0131-0003-01, 500 W, con conjunto de espejo de 310 nm). Las mezclas candidatas que poseían un cromóforo BrdU se irradiaron durante 37 segundos, las que poseían un cromóforo ANA se irradiaron durante 60 segundos, y las que poseían un cromóforo AQ o psoraleno se irradiaron durante 10 minutos. Se usó un filtro adicional (placa de vidrio de 5 mm) para los cromóforos ANA, AQ y psoraleno para eliminar longitudes de onda innecesarias, pero potencialmente perjudiciales, por debajo de 320 nm. Se capturaron complejos como anteriormente, y se retiró el ADN no reticulado lavando las perlas una vez con guanidina-HCl 4 M + TWEEN-20 0,05 % 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 perlas para las etapas de amplificación.

D. Amplificación y purificación de aptámeros

Se amplificó y cuantificó ADN de aptámero seleccionado por QPCR. Se añadieron 48 μ l de ADN a 12 μ l de Mezcla de QPCR (tampón de ADN polimerasa KOD 5X, MgCl₂ 25 mM, cebador de PCR directo 10 μ M, cebador de PCR inverso biotilado 10 μ M, SYBR Green I 5X, ADN polimerasa KOD XL 0,125 U/ μ l y 1 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y se sometió a termociclador en un instrumento MyIQ QPCR Bio-Rad con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 99,9 °C, 15 s, 55 °C, 10 s, 68 °C, 30 min, 30 ciclos de 99,9 °C, 15 segundos, 72 °C, 1 minuto. Se realizó cuantificación con el software del instrumento y el número de copias de ADN seleccionado con y sin proteína diana se comparó para determinar las relaciones de señal/fondo.

Cuando se empleó fotoselección, se preparó una copia de ADNc del ADN seleccionado por extensión de cebadores en la superficie de las perlas. Las perlas lavadas se resuspendieron en 20 μ l de mezcla de extensión de ADNc (tampón de extensión de cebadores que contenía cebador de PCR inverso 5 μ M, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP y ADN polimerasa KOD XL 0,125 U/ μ l) y se incubó a 68 °C durante 30 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron 3 veces con SB17T, y la cadena de aptámero se eluyó de las perlas añadiendo 85 μ l de NaOH 20 mM, e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 μ l de eluato de aptámero a un nuevo tubo después de la separación magnética, se neutralizó con 20 μ l de HCl 80 mM y se tamponó con 1 μ l de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5. El ADNc se amplificó y cuantificó por QPCR como anteriormente para los 30 ciclos de 99,9 °C, 15 segundos, 72 °C, 1 minuto.

Después de la amplificación, el producto de PCR se capturó en perlas SA mediante la cadena antisentido biotilada. Se lavaron 1,25 ml de perlas SA (10 mg/ml) dos veces con 0,5 ml de NaOH 20 mM, una vez con 0,5 ml de SB 17T, se resuspendieron en 1,25 ml de NaCl 3 M + Tween 0,05 % y se almacenaron a 4 °C. Se añadieron 25 μ l de perlas SA (10 mg/ml en NaCl 3M) a 50 μ l de producto de QPCR bicatenario y se incubó a 25 °C durante 5 minutos con

mezclado. Las perlas se lavaron una vez con SB17T, y la cadena “con sentido” se eluyó de las perlas añadiendo 200 µl de NaOH 20 mM, e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. La cadena eluida se descartó y las perlas se lavaron 3 veces con SB17T y una vez con NaCl 16 mM.

- 5 La cadena con sentido de aptámero se preparó con el cromóforo apropiado por extensión de cebadores de la cadena antisentido inmovilizada. Las perlas se resuspendieron en 20 µl de mezcla de reacción de extensión de cebadores (tampón de extensión de cebadores 1 x, MgCl₂ 1,5 mM, cebador directo 5 µM con cromóforo 5' apropiado, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y BndUTP y ADN Polimerasa KOD XL 0,125 U/µl) y se incubó a 68 °C durante 30 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron 3 veces con SB 17T, y la cadena de aptámero se eluyó de las perlas añadiendo 85 µl de NaOH 20 mM e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 µl de eluato de aptámero a un nuevo tubo después de separación magnética, se neutralizó con 20 µl de HCl 80 mM y se tamponó con 5 µl de HEPES 0,1 M, pH 7,5.

15 E. Rigurosidad y retroalimentación de selección

Se ajustó la proteína diana en cada ronda como se ha descrito en el Ejemplo 1. Después de cada ciclo de selección, el estado de convergencia del grupo enriquecido se determinó como se ha descrito en el Ejemplo 1.

20 F. Constantes de unión en equilibrio de bibliotecas enriquecidas

La afinidad de unión se determinó como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior, pero con perlas de captura SA. La siguiente tabla, Tabla 2, resume las constantes de unión en equilibrio (K_d) obtenidas usando el protocolo de photoSELEX con proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta.

- 25 Tabla 2. Constantes de unión en equilibrio (K_d) de las bibliotecas enriquecidas seleccionadas con diferentes cromóforos, presentadas en unidades de molaridad. No se realizaron mediciones en bibliotecas que no convergían (indicado con una x).

Proteína Diana	BrdU	AQ	ANA	Psor
β-catenina	2,7x10 ⁻⁸	3,6x10 ⁻⁹	1,1x10 ⁻⁹	1,6x10 ⁻⁹
bFGF	3,1x10 ⁻⁸	5,7x10 ⁻¹⁰	7,1x10 ⁻¹⁰	5,1x10 ⁻¹⁰
CMP-SAS	x	6,2x10 ⁻⁹	7,3x10 ⁻⁹	4,9x10 ⁻⁸
Endostatina	1,3x10 ⁻⁹	8,7x10 ⁻¹⁰	8,8x10 ⁻¹⁰	1,3x10 ⁻⁹
IL-6	1,0x10 ⁻⁹	5,4x10 ⁻¹⁰	4,0x10 ⁻¹⁰	x
mieloperoxidasa	6,0x10 ⁻¹⁰	2,8x10 ⁻¹⁰	5,0x10 ⁻¹⁰	1,5x10 ⁻¹⁰
SDF-1β	8,1x10 ⁻¹⁰	5,7x10 ⁻¹⁰	3,8x10 ⁻¹⁰	x
TIMP-1	5,2x10 ⁻⁹	7,3x10 ⁻⁹	8,9x10 ⁻⁹	x
VEGF	7,2x10 ⁻¹⁰	4,2x10 ⁻⁹	5,5x10 ⁻¹⁰	x
vWF	2,6x10 ⁻⁸	8,8x10 ⁻⁹	8,1x10 ⁻⁹	x

30 G. Ensayo de actividad de reticulación

El rendimiento de reticulación de bibliotecas enriquecidas se determinó midiendo el porcentaje de ADN reticulado con proteína en condiciones de proteína de saturación y luz. Se mezcló ADN radiomarcado (50 pM) con cebador inverso (16 nM) en SB17T, se calentó a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió a 37 °C a 0,1 °C/segundo. Se añadió proteína diana a la mezcla de ADN hasta una concentración final de 10 nM y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se prepararon simultáneamente muestras de control sin proteína. Las muestras se reticularon con las condiciones específicas de 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 por PAGE de desnaturalización, FIGURA 7, y se cuantificaron y los resultados se presentan en la Tabla 3.

- 40 Tabla 3. Rendimientos de reticulación de las bibliotecas enriquecidas seleccionadas con diferentes cromóforos, presentados en unidades de porcentaje de ADN total reticulado con proteína. No se realizaron mediciones en bibliotecas que no convergían (indicado 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

5 A. Preparación de mezclas candidatas

Se prepararon mezclas candidatas que contenían dATP, dCTP, dGTP y BndUTP por extensión de polimerasa de un cebador hibridado con un molde biotinilado para 94 dianas proteicas. Se combinaron 55 nmoles de cebador directo (con cromóforo ANA 5') y 55 nmoles de molde en 0,5 ml de tampón de extensión de cebadores (Tris-HCl 120 mM, pH 7,8, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, MgSO₄ 7 mM, BSA 0,1 mg/ml, Triton X-100 0,1 %), se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, 70 °C durante 5 minutos, 48 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. La mezcla cebador:molde se añadió a una reacción de extensión de 5,5 ml que contenía tampón de extensión de cebadores, ADN polimerasa KOD XL 0,125 U/ μ l y 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y BndUTP y se incubó a 70 °C durante 60 minutos. Después de completar la reacción de extensión, la solución se enfrió en hielo. Se capturó producto bicatenario mediante las biotinas de cadena de molde añadiendo 25 ml de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (MagnaBind-Estreptavidina, Pierce, 5 mg/ml en NaCl 1 M + TWEEN-20 0,05 %) al producto de extensión de cebadores e incubando a 25 °C durante 15 minutos con rotación. Las perlas se lavaron tres veces con 40 ml de tampón SB17T (HEPES 40 mM, pH 7,5, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, TWEEN-20 0,05 %). La cadena de aptámero se eluyó de las perlas con 35,2 ml de NaOH 20 mM durante 5 minutos con agitación. La cadena 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. Las mezclas candidatas se concentraron con un Centricon-30 hasta aproximadamente 0,7 ml y se cuantificaron por espectroscopia de absorbancia de UV.

25 B. Preparación de proteínas diana

Se biotinilaron proteínas diana no marcadas como se ha descrito en el Ejemplo 2.

C. Selección de aptámeros con proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotorreticulación

30 Se realizaron selecciones por separado como se ha descrito en el Ejemplo 2, con la adición de sulfato de dextrano 10 mM como un competidor para la reunión de aptámero durante el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta en los ciclos seis a nueve.

35 El proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta se empleó de tres maneras diferentes. En los ciclos dos y tres, se diluyeron muestras 20X añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de capturar los complejos. En los ciclos cuatro y cinco, las muestras se diluyeron 20X añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de la reticulación. En los ciclos seis y siete, las muestras se diluyeron 20X añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C). Se diluyeron 50 μ l de cada muestra diluida de nuevo transfiriendo a 950 μ l de SB17T + sulfato de dextrano 5000K 10 mM (precalentado a 37 °C) para proporcionar una dilución general 400X, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos antes de la reticulación. En los ciclos ocho y nueve, las muestras se diluyeron 20X añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C) y se diluyeron 50 μ l de cada muestra de nuevo transfiriendo a 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C) para proporcionar una dilución 400X. Finalmente, se diluyeron 50 μ l de cada muestra diluida 400X de nuevo transfiriendo a 950 μ l de SB17T + sulfato de dextrano 5000K 10 mM (precalentado a 37 °C) para proporcionar una dilución general 8000X, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos antes de la reticulación. Los complejos se capturaron y se lavaron como se ha descrito 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 un conjunto de LED de 470 nm durante 60 segundos antes de la captura de complejo como en el Ejemplo 2.

50

D. Amplificación y purificación de aptámeros

Se realizaron amplificación y purificación como en el Ejemplo 2.

5 E. Rigurosidad y retroalimentación de selección

La proteína diana se ajustó en cada ciclo como se ha descrito en el Ejemplo 1, excepto en los ciclos seis y ocho. Para maximizar la señal después de estas grandes diluciones, la proteína diana se aumentó hasta 100 nM para los ciclos seis y ocho. Después de cada ciclo de selección, se determinó el estado de convergencia del grupo enriquecido como se ha descrito en el Ejemplo 1.

F. Protocolo de determinación de la constante de velocidad de disociación.

La constante de disociación para la disociación del complejo aptámero:proteína (k_{off}) se determinó para cada aptámero midiendo la fracción de complejos de aptámero/proteína preformados que permanecían unidos después de dilución en 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 proteína a una concentración 10X mayor que el valor de K_d medido. Las muestras se diluyeron 100X con SB17T-0,002 a 37 °C y las alícuotas se retiraron en diversos puntos temporales y se dividieron para separar el aptámero libre de complejos de proteína:aptámero. Se consiguió división añadiendo resina ZORBAX (Agilent) a la muestra, capturando complejos en la resina, pasando la muestra a través de una membrana DuraPore al vacío, y lavando la resina con SB17T-0,002. Para proteínas no capturadas eficazmente con resina ZORBAX, se realizó el ensayo con proteína biotinilada en SB 17T y se consiguió división capturando complejos con perlas SA. La cantidad de complejo restante en cada punto temporal se determinó cuantificando el aptámero radiomarcado en la resina con un detector de imágenes fotoestimulable FUJI FLA-3000. La fracción del complejo se representó en función del tiempo y la constante de velocidad de disociación (k_{off}) y valor de semivida de disociación ($t_{1/2}$) se determinó ajustando los datos a una expresión analítica para cinética de disociación bimolecular usando regresión no lineal.

G. Propiedades cinéticas de algunos aptámeros

La siguiente tabla, Tabla 4, resume los valores de semivida de disociación ($t_{1/2}$) obtenidos para aptámeros seleccionados frente a 10 dianas usando este protocolo.

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

Proteína Diana	$t_{1/2}$ (min)
bFGF R	66
C3	164
catalasa	58
FGF-17	91
fosfolipasa A2 grupo IB	40
HB-EGF	49
HCC-4	143
IL-6 sR	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 de SELEX de afinidad descrito en el Ejemplo 1 o los métodos de foto SELEX descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands" sin un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta (Figura 4A). Los valores de $t_{1/2}$ también se midieron y se representaron para 72 aptámeros que se seleccionaron por el proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta descrito en el Ejemplo 2 con un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta por dilución o dilución con competidor (Figura 4B). El valor de $t_{1/2}$ promedio para aptámeros usando los nucleótidos modificados 5-(N-bencilcarboxiamida)-dUTP (BndUTP), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-dUTP (iBudUTP) o 5-(N-

triptaminocarboxiamida)-dUTP (TrpdUTP) seleccionados en ausencia de un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de 20 minutos con algunos aptámeros que tenían un valor de $t_{1/2}$ de hasta una hora. Este es sustancialmente mayor que el que se ha descrito previamente con bases naturales u otros nucleótidos modificados. El promedio para aptámeros seleccionados con un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta fue de más de 85 minutos, teniendo algunos aptámeros un valor de $t_{1/2}$ de más de cuatro horas.

EJEMPLO 5. Generación de aptámeros de una biblioteca aleatoria de NapdU

A. Preparación de mezclas candidatas

Se prepararon mezclas candidatas que contenían dATP, dCTP, dGTP y NapdU como se ha descrito en el Ejemplo 3 pero sin el grupo fotorreactivo ANA 5'.

B. Inmovilización de proteínas diana

Las proteínas diana contenían un marcador (His)₆ y se capturaron con perlas Talon como se ha descrito en el Ejemplo 1.

C. Selección de aptámeros con proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta

Se realizó selección de aptámeros como se ha descrito en el Ejemplo 3, pero sin fotorreticulación.

D. Amplificación y purificación de aptámeros

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

E. Rigurosidad y retroalimentación de selección

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

F. Propiedades de aptámeros

La constante de unión en equilibrio (K_d) de cuatro aptámeros de esta selección se enumera en la Tabla 5.

Tabla 5. Constantes de unión en equilibrio (K_d) de aptámeros de NapdU

Proteína Diana	K_d (M)
bFGF	$1,1 \times 10^{-9}$
Endostatina	$2,0 \times 10^{-10}$
TIMP-3	$1,5 \times 10^{-10}$
VEGF	$7,2 \times 10^{-10}$

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

Se prepararon mezclas candidatas que contenían dATP, dCTP, dGTP y BndUTP mediante extensión por polimerasa de un cebador con un cromóforo ANA 5' y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

B. Selección de aptámeros y proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotorreticulación

Se realizó selección de aptámeros como se ha descrito 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 de aptámeros

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

D. Rigurosidad y retroalimentación de selección

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

E. Propiedades de aptámeros

La constante de unión en equilibrio (K_d) de un aptámero de esta selección fue de $1,2 \times 10^{-8}$ M (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 FIGURA 13A y la FIGURA 13B.

EJEMPLO 7. Se permitieron mediciones de proteínas en especímenes por aptámeros con velocidades de disociación lentas

A. Preparación de mezclas de aptámero/cebador y especímenes

Se mezclaron aptámeros con un marcador de detección Cy3 de biotina (4 nM cada uno) con un exceso 3x de sonda de captura (oligonucleótido complementario a la región fijada 3' del aptámero que contiene un marcador de biotina y un elemento fotoescindible) en SB17T 1X y se calentó a 95 °C durante 4 minutos, después 37 °C durante 13 minutos, y se diluyó 1:4 en SB17T 1x. Se añadieron 55 µl de mezcla de aptámero/cebador a una placa de microtitulación (Hybaid n.º AB-0407) y se selló con papel metálico. Se prepararon especímenes en una placa de microtitulación mezclando concentraciones conocidas de analitos proteicos en SB 17T y diluyendo en serie con SB17T.

B. Equilibrado de muestras

Se añadieron 55 µl de mezcla de aptámero/cebador a 55 µl de especímenes y se incubó a 37 °C durante 15 minutos en una placa de microtitulación sellada con papel metálico. La concentración final de cada aptámero en la mezcla de equilibrado fue de 0,5 nM. Después del equilibrado, todas las etapas posteriores de este método se realizaron a temperatura ambiente a no ser que se indique de otro modo.

C. Captura de aptámeros y retirada de proteína libre

Una placa de filtración DuraPore (Millipore HV cat n.º MAHVN4550) se lavó una vez con 100 µl de SB 17T 1X por filtración al vacío, se añadieron 133,3 µl de resina de estreptavidina-agarosa 7,5 % (Pierce) a cada pocillo y se lavó dos veces con 200 µl de SB17T 1X. Se transfirieron 100 µl de muestras equilibradas a la placa Durapore que contenía la resina de estreptavidina-agarosa y se incubó en un termomezclador (Eppendorf) a 800 rpm durante 5 minutos. La resina se lavó una vez con 200 µl de SB17T 1X + biotina 100 µM y una vez con 200 µl de SB17T 1X.

D. Marcaje de proteínas con biotina

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

E. Proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotoescisión

Se retiró el director de goteo de la parte inferior de la placa DuraPore y la placa se colocó sobre una placa de recogida de microtitulación de 1 ml. La resina se lavó una vez con 200 µl de SB17T 1X por centrifugación a 1000 x g durante 30 segundos. Se añadieron 80 µl de SB17T 1 x + sulfato de dextrano 10 mM a la resina y se irradió con una lámpara de mercurio BlackRay en un termomezclador a 800 rpm durante 10 minutos. La placa de DuraPore se transfirió a una nueva placa deepwell de 1 ml y se centrifugó a 1000 x g durante 30 segundos para recoger el aptámero fotoescindido y los complejos de proteína:aptámero.

F. Captura de proteína y retirada de aptámero libre

Se añadieron 50 µl de perlas paramagnéticas de MyOne-estreptavidina C1 (Invitrogen) (10 mg/ml en SB17T 1X) a una placa de microtitulación. Las perlas se separaron con un imán durante 60 segundos y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 225 µl de mezcla de fotoescisión a las perlas y se mezclaron durante 5 minutos. Las perlas se lavaron cuatro veces con 200 µl de SB 17T 1X separando las perlas magnéticas y reemplazando el tampón de lavado. Se retiró el tampón de lavado final.

G. Elución de aptámero

Se añadieron 100 µl de tampón de elución de fosfato sódico (Na_2HPO_4 10 mM, pH 11) a las perlas y se mezcló durante 5 minutos. Se transfirieron 90 µl de eluato a una placa de microtitulación y se neutralizó con 10 µl de tampón de neutralización de fosfato sódico (NaH_2PO_4 10 mM, pH 5).

H. Hibridación de aptámero con micromatrices

Se prepararon matrices de ADN con sondas de captura oligonucleotídicas comprendidas 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 los submatrices se separaron físicamente fijando una junta (Grace) para la misma aplicación. Las matrices se pretrataron con 100 µl de tampón de bloqueo y se incubaron durante 15 minutos a 65 °C en un termomezclador. Se añadieron 30 µl de tampón de hibridación de alta salinidad a 90 µl de eluato de aptámero neutralizado en una placa de microtitulación, se incubaron a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador y se enfriaron hasta 65 °C a 0,1 °C/segundo. Se retiró el tampón de bloqueo de las matrices y se añadieron 110 µl de muestra de aptámero a las matrices y se incubó en una cámara húmeda a 65 °C durante 20 horas.

I. Lavado de matrices

Se retiró la muestra de aptámero de las matrices, y las matrices se lavaron una vez con 200 µl de tampón de lavado Tween-20 de fosfato sódico a 65 °C, con la junta en su sitio, y tres veces con 25 ml de fosfato sódico, tampón de lavado Tween-20 a 65 °C en un frasco de citología con la junta retirada. Las matrices se secaron con una pistola de nitrógeno.

J. Cuantificación de señal en matrices

Los portaobjetos de las matrices se exploraron en un TECAN LS300 recargado en un canal apropiado para detección de Cy3 y se cuantificó la señal de Cy3 en cada elemento de matriz.

25 Resultados:

Se produjeron aptámeros específicos para tres dianas diferentes (bFGF, VEGF y Mieloperoxidasa) usando métodos y materiales de SELEX tradicionales. Se preparó un segundo conjunto de aptámeros específico para el mismo conjunto de dianas usando nucleótidos modificados en la posición 5 y se seleccionó con respecto a velocidades de disociación muy lentas para sus dianas respectivas. Los aptámeros preparados en el proceso tradicional tuvieron velocidades de disociación medidas del orden de menos de 5 minutos. Los aptámeros preparados con los nucleótidos modificados y usando procesos de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta durante la selección tuvieron velocidades de disociación de más de 20 minutos. Se prepararon 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 especímenes se evaluó como se ha descrito anteriormente sobre una serie de concentraciones diana. La señal relativa de la detección de microplaca de ADN se representó frente a la concentración de diana de entrada. Véanse Figuras 12A a 12C. 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 con los aptámeros de velocidad de disociación lenta es excelente. Los datos apoyan la necesidad de usar los aptámeros de velocidad de disociación lenta para rendimiento analítico máximo.

EJEMPLO 8. Generación de aptámeros de BndU de alta afinidad para trombina humana

45 A. Preparación de mezcla candidata

Se preparó una mezcla candidata que contenía dATP, dCTP, dGTP y BndUTP por extensión de polimerasa de un cebador con un cromóforo ANA 5' y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 3.

50 B. Preparación de proteína diana

Se marcó trombina humana con biotina como se ha descrito en el Ejemplo 2.

55 C. Selección de aptámeros con enriquecimiento de velocidad de disociación lenta y fotoreticulación

Se realizó selección de aptámeros como se ha descrito en el Ejemplo 3 con trombina humana biotilada como la diana.

60 D. Amplificación y purificación de aptámeros

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

E. Rigurosidad y retroalimentación de selección

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

F. Propiedades de aptámero

La constante de unión en equilibrio (K_d) del aptámero 2336-17 de esta selección con un BndU modificado fue de $4,4 \times 10^{-11}$ M (medido de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1) como se demuestra en la Figura 15.

5 En la técnica, se han seleccionado aptámeros de ADN monocatenarios para trombina humana a partir de una biblioteca comprendida por nucleótidos dA, dC, dG y dT naturales (Bock, *et al.*, "Selection of Single-Stranded DNA Molecules that Bind and Inhibit Human Thrombin," *Nature* (1992) 355: 564-566). Las afinidades de unión de los aptámeros tuvieron valores de K_d que variaron de $2,5 \times 10^{-8}$ M a $2,0 \times 10^{-7}$ M. Usando un protocolo similar con una biblioteca comprendida por dA, dC, dG naturales y 5-(1-pentilil)-dUTP modificado, se seleccionaron aptámeros con valores de K_d que variaban de 4×10^{-7} M a 1×10^{-6} M (Latham, *et al.*, "The Application of a Modified Nucleotide in Aptamer Selection: Novel Thrombin Aptamers Containing 5-(1-Pentynyl)-2'-Deoxyuridine," *Nucleic Acid Research* (1994) 22(14): 2817-2822).

15 Se pretende que los ejemplos en las publicaciones citadas y limitaciones relacionadas con los mismos sean ilustrativos y no exclusivos. Otras limitaciones de las publicaciones citadas resultarán evidentes para los expertos en la materia tras una lectura de la memoria descriptiva y un estudio de los dibujos.

EJEMPLO 9. Generación de aptámeros de BndU de alta afinidad para Her2 (ErbB-2) y aplicaciones histológicas

20 A. Preparación de mezcla candidata

Se preparó una mezcla candidata que contenía dATP, dCTP, dGTP y BndUTP y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 5.

25 B. Inmovilización de proteínas diana

Se obtuvo una fusión de F_c marcada con His del dominio extracelular de HER2 de R&D Systems y se capturó con perlas Talon como se ha descrito en el Ejemplo 1.

30 C. Selección de aptámeros con enriquecimiento de velocidad de disociación lenta

Se realizó selección de aptámeros como se ha descrito en el Ejemplo 5.

35 D. Amplificación y purificación de aptámeros

Se realizaron amplificación y purificación como se ha descrito en el Ejemplo 5.

40 E. Rigurosidad y retroalimentación de selección

Se realizaron rigurosidad y realimentación de selección como se ha descrito en el Ejemplo 5.

F. Propiedades de aptámeros

45 La constante de unión en equilibrio (K_d) del aptámero 2616-24 de esta selección con un BndU modificado fue de $1,5 \times 10^{-8}$ M.

Se sintetizó aptámero de HER2 con modificaciones 5' incluyendo biotina y Cy3 como se muestra en la FIGURA 16 y se ensayó con respecto a su capacidad para teñir proteína HER2 en cortes de tejido de carcinoma de mama congeladas. Se obtuvieron muestras tisulares desidentificadas a partir de escisión quirúrgica y especímenes de autopsia. El tejido se congeló inmediatamente después de la escisión quirúrgica en medio OCT, y se almacenó a -70 °C hasta seccionarlo. Se realizó análisis de inmunohistoquímica (IHC) del estado de HER2 usando metodología convencional por personal de patología del hospital, y se tomaron resultados de los registros médicos de los pacientes antes de la desidentificación de los especímenes. Se prepararon cortes de tejido congelados de $5 \mu\text{m}$ en un criostato y se colocaron inmediatamente en un portaobjetos con carga (Superfrost plus), y el portaobjetos se sumergió después en una solución fijadora (etanol o acetona 100 %) durante al menos 1 hora. Se retiró medio OCT de los portaobjetos mediante un aclarado de 2 minutos en agua desionizada, seguido de aclarado de 5 minutos en tampón SB18 (Na-HEPES 40 μM , pH 7,5, NaCl 52 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 5 mM, Tween-20 0,05 %). Se aplicaron soluciones de aptámero 10-1000 nM compuestas en tampón SB18, con o sin sulfato de dextrano (SD) 1 mM durante diversos tiempos a secciones aclaradas y después se lavaron durante 5 minutos con SB18 +/- sulfato de dextrano (SD) 1 mM. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia con un microscopio vertical Nikon 80i equipado con cámara Digital Sight DS-Ri1, fuente de iluminación de lámpara de mercurio y densidad neutra y filtros ópticos apropiados para DAPI o captura de imágenes de Cy3. Se capturaron imágenes de disociación de aptámero nuclear rápida a 5 Hz. Para experimentos de ciclo temporal, se tomaron pruebas sin la adición de reactivos para confirmar que el fotoblanqueador no era una fuente significativa de degradación de fluorescencia a lo largo del periodo de tiempo observado.

En presencia de SD 1 mM, el aptámero de HER2 se une con membranas celulares (FIGURA 17A, B) en el patrón morfológico esperado en tumores de mama congelados que se han clasificado por inmunohistoquímica (IHC) como poseedores de expresión de HER2 3+, pero no se une con tumores de mama clasificados por IHC como 0/negativos, o tejidos de control negativo no de mama (FIGURA 17 C). En ausencia de SD, el aptámero de HER2 se une con núcleos, citoplasma y estroma en cualquier tejido al que se aplique, sin localización membranosa significativa en tejido de carcinoma de mama IHC HER2 3+ (FIGURA 18A). La aplicación del aptámero de HER2 solo a tejido de carcinoma de mama IHC HER2 3+, seguido de un lavado de tampón y 30 minutos de incubación con SD (Figura 18B), recapitula el patrón de tinción observado cuando se coaplica SD con el aptámero, lo que indica que la unión no específica es reversible. Un oligonucleótido mezclado con la misma composición de base pero secuencia aleatoria muestra solamente unión nuclear en tejido de carcinoma de mama, que solamente puede evitarse o invertirse parcialmente con SD (no mostrado).

La cinética de asociación de unión de aptámero de HER2 específico en tejido congelado es bastante rápida, saturando su diana en menos de 5 minutos cuando se aplica a 100 nM (FIGURA 19A-C) y menos de 1 minuto cuando se aplica a 1 μ M (FIGURA 19D). La velocidad y simplicidad de la tinción indican que un ensayo rápido que se dirige a una proteína con relevancia de diagnóstico en la situación intraoperatoria podría ayudar a identificar carcinoma metastásico oculto en ganglios linfáticos centinela.

Se evaluó la cinética de unión en tejido cargando una sección congelada de carcinoma de mama HER2+ con aptámero de HER2 fluorescente en ausencia de SD (generando un patrón de tinción como se ve en la FIGURA 18A), lavando en tampón solamente y después añadiendo SD 1 mM en ausencia de aptámero. En estas condiciones, la mayoría de la tinción nuclear no específica se perdió en segundos (FIGURA 20A); una fracción pequeña de fluorescencia nuclear residual, <10 % del total, se degradó más lentamente durante 30-60 minutos, lo que indica que se produce unión no específica en al menos dos compartimentos.

En un segundo experimento, se incubó una sección congelada de carcinoma de mama HER2+ con aptámero de HER2 fluorescente en presencia de SD (generando un patrón de tinción como se ve en la FIGURA 17A), se lavó en tampón solamente, y después se añadió SD 1 mM más aptámero de HER2 no fluorescente 100 nM. Se perdió tinción membranosa específica durante 30-45 minutos, a medida que los aptámeros no fluorescentes reemplazaron el aptámero fluorescente disociado (Figura 20B). La velocidad de disociación del aptámero de su diana en la membrana fue ~100 veces más lenta que la velocidad de disociación de los sitios de unión no específicos en el núcleo. En este experimento, así como en el experimento previo, la autofluorescencia tisular evitó que la señal medida se degradara hasta cero.

35 EJEMPLO 10. Generación de aptámeros de BndU de alta afinidad para receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB-1) y aplicaciones histológicas

A. Preparación de mezcla candidata

40 Se preparó una mezcla candidata que contenía dATP, dCTP, dGTP y BndUTP y se purificó como se ha descrito en Ejemplo 5.

B. Inmovilización de proteína diana

45 Se marcó una fusión de F_c de EGFR con biotina como se ha descrito en el Ejemplo 2, y se capturó con perlas de estreptavidina.

C. Selección de aptámero con enriquecimiento de velocidad de disociación lenta

50 Se realizó selección de aptámero como se ha descrito en el Ejemplo 5.

D. Amplificación y purificación de aptámero

55 Se realizaron amplificación y purificación como se ha descrito en el Ejemplo 5.

E. Rigurosidad y retroalimentación de selección

Se realizaron rigurosidad y retroalimentación de selección como se ha descrito en el Ejemplo 5.

60 F. Propiedades de aptámeros

La constante de unión en equilibrio (K_d) del aptámero 3138-49 con su proteína diana fue de $1,3 \times 10^{-9}$ M y la K_d del aptámero 3159-1 fue de $1,4 \times 10^{-10}$ M.

65 Se sintetizaron aptámeros de EGFR con modificaciones 5' incluyendo biotina y Cy3 como se muestra en la FIGURA 16 y se ensayaron con respecto a su capacidad para teñir proteína de EGFR en cortes de tejido de piel humana

- congeladas. La preparación y tinción del tejido fueron como se ha descrito en el Ejemplo 9 excepto que se usó tejido cutáneo congelado en lugar de tejido de carcinoma de mama. El aptámero para EGFR se comporta de forma similar al aptámero de HER2, uniéndose con núcleos en epidermis humana normal congelada si se aplica en ausencia de SD (no mostrado), pero uniéndose en el patrón membranoso epidérmico predominantemente basal, esperado, cuando se coincubó (FIGURA 21) o se postincubó con SD (no mostrado). Se demostraron tanto la detección fluorescente directa de EGFR, usando aptámero marcado con Cy3 (FIGURAS 21A y B) como detección colorimétrica usando peroxidasa de rábano rústico (FIGURA 21C). El aptámero de EGFR no mostró ninguna tinción en diversos tejidos que se sabe que carecen de expresión de EGFR (no mostrado).
- 5
- 10 EJEMPLO 11 Generación de aptámeros de BndU de alta afinidad para antígeno específico de próstata (PSA) y aplicaciones histológicas
- A. Preparación de mezcla candidata
- 15 Se preparó una mezcla candidata que contenía dATP, dCTP, dGTP y BndUTP y se purificó como se ha descrito en el Ejemplo 5.
- B. Inmovilización de proteína diana
- 20 Se marcó PSA nativo purificado a partir de líquido seminal con biotina como se ha descrito en el Ejemplo 2, y se capturó con perlas de estreptavidina.
- C. Selección de aptámeros con enriquecimiento de velocidad de disociación lenta
- 25 Se realizó selección de aptámeros como se ha descrito en el Ejemplo 5.
- D. Amplificación y purificación de aptámeros
- Se realizaron amplificación y purificación como se ha descrito en el Ejemplo 5.
- 30 E. Rigurosidad y retroalimentación de selección
- Se realizó rigurosidad y retroalimentación de selección como se ha descrito en el Ejemplo 5.
- 35 F. Propiedades de aptámeros
- La constante de unión en equilibrio (K_d) de aptámero de PSA con su proteína diana fue de 1×10^{-9} M.
- El aptámero de PSA se sintetizó con modificaciones 5' incluyendo biotina y Cy3 como se muestra en la FIGURA 16.
- 40 Se conjugó Aptámero-Qdot 605 estreptavidina a una concentración de aptámero final de 20 nM, con una relación de etiquetado de aptámero-nanopartícula de 40:1 en tampón de HBS-T (HEPES 40 mM pH 7,5, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Tween 20 0,05 %). La mezcla se incubó con agitación a 650 rpm durante 60 minutos a 22 °C. La reacción se detuvo con d-biotina 200 µg/ml para complejo Qdot (20-30 minutos). El exceso de biotina se retiró por ultrafiltración. Se realizó tinción por aptámero de tejido de próstata congelado en secciones de 5 µm de grosor de
- 45 tejido congelado incluido en OCT crioseccionado en portaobjetos de vidrio con carga positiva. Los portaobjetos de tejido seccionado se almacenaron en acetona (o, como alternativa, etanol absoluto) a 4 °C hasta su uso y con cuidado de no dejar el tejido secar al aire. Los portaobjetos de cortes de tejido se aclararon durante un par de minutos en agua DI para retirar el medio de inclusión OCT. Se usó una servilleta de papel para secar alrededor de la sección, después se usó un bolígrafo de barrera hidrófobo VectorLab ImMEdge para dibujar un perímetro alrededor del corte de tejido para minimizar el volumen de ensayo del portaobjetos. Se añadió el conjugado de aptámero-Qdot 605 (aptámero-Qdot 20 nM, Sulfato de Dextrano 1 mM) directamente a los cortes de tejido en portaobjetos durante
- 50 60 minutos. Los portaobjetos se lavaron después secuencialmente sumergiendo brevemente cada portaobjetos en HBS-T durante dos minutos después de retirar por transferencia la solución de tinción de aptámero. Los portaobjetos teñidos se cubrieron con cubreobjetos con Fluoromount-G que se había complementado con Mg²⁺ 10 mM y reactivo anti destinción de n-propil galato 15 mM. Como comparador, se realizó inmunofluorescencia (IF) de tejido de
- 55 próstata usando un anticuerpo fluorescente específico de PSA (FIGURA 22A). La tinción con el aptámero de PSA conjugado con Qdot (FIGURA 22B, C) proporcionó un patrón de tinción comparable al visto con IHC. La tinción fue citosólica (FIGURA 22D, E) coherente con la localización subcelular esperada de PSA.
- 60 Las palabras “comprender”, “comprende” y “comprendiendo” deben interpretarse de forma inclusiva en lugar de exclusiva.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Somalogic, Inc. Zichi, Dominic Wilcox, Sheri K. Bock, Chris Schneider, Daniel J. Eaton, Bruce Gold,
 Larry Jarvis, Thale C. Carter, Jeffrey D.
 5
 <120> Método para generar aptámeros con velocidades de disociación mejoradas
 <130> 0057.32PCT
 10 <150> 12/499.967
 <151> 09-07-2009
 <160> 23
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 79
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sintética
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(62)
 <223> n e s a , c , g o t
 30 <400> 1

ababgtcttc ttgtcgtttc gcnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnggtggagt gtggtgagg 79
 <210> 2
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sintética
 <400> 2
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25
 45 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Sintética
 <400> 3
 ababttttt ttgtcttctt gtcgttcgc 30
 55 <210> 4
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Sintética

ES 2 610 633 T3

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

ababccgtcc tectctccgt cccccccccc nnnnnnnnnn rrrrrrrrrrrr tttttttttttt **60**
ngggacactg ggtgcagg **78**
 10
 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 5
 atatatatcc tgcaccaggc gtccc 25
 20
 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 6
 ababttttt ttccgtctc ctctccgtc 29
 30
 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 7
 gtcttctgt cgtttcgc 18
 40
 <210> 8
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Sintética

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(59)
 <223> n es a, c, g o t
 50
 <400> 8

ababcccgtc cgtcgtctgn nnnnnnnnnn rrrrrrrrrrrr tttttttttttt **60**
aggcagacgg tcactc **76**
 60
 <210> 9
 <211> 25

ES 2 610 633 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 9	
	atatatatga gtagccgtct gcctg	25
10	<210> 10	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 10	
20	atatatatga gtagccgtct gcctg	25
	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 11	
30	atatatatga gtagccgtct gcctg	25
	<210> 12	
	<211> 25	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 12	
40	atatatatga gtagccgtct gcctg	25
	<210> 13	
	<211> 25	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 13	
50	atatatatga gtagccgtct gcctg	25
	<210> 14	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Sintética	
	<400> 14	
	tttttttcc cgctcgctg ctg	23
65	<210> 15	
	<211> 27	

ES 2 610 633 T3

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 15		
	ababttttt ttccgctcg tegtctg	27	
10	<210> 16		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Sintética		
	<220>		
	<221> misc_feature		
20	<222> (23)..(62)		
	<223> n e s a, c, g o t		
	<400> 16		
	ababgtgtct gtctgtgtcc tennnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn		60
25	nnggtggagt gtggtgagg		79
	<210> 17		
	<211> 25		
30	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
35	<400> 17		
	atatatatcc tcaccacact ccacc 25		
	<210> 18		
40	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
45	<400> 18		
	atatatatcc tcaccacact ccacc	25	
	<210> 19		
50	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
55	<223> Sintética		
	<400> 19		
	atatatatcc tcaccacact ccacc	25	
60	<210> 20		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		

ES 2 610 633 T3

<220>
<223> Sintética

5 <400> 20
atatatatcc tcaccacact ccacc 25

10 <210> 21
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Sintética

<400> 21
atatatatcc tcaccacact ccacc 25

20 <210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Sintética

<400> 22
tttttttgt gtctgtctgt gtctc 26

30 <210> 23
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 23
ababttttt ttgtgtctgt ctgtgcctc 30

REIVINDICACIONES

1. Un método de evaluación citológica o histológica de una muestra tisular para detectar una o más dianas potenciales en dicha muestra tisular, comprendiendo el método:
- 5 a) poner en contacto un primer corte de tejido, preparado a partir de la muestra tisular, con una solución que comprende un aptámero para una diana;
- b) incubar el primer corte de tejido y la solución que comprende un aptámero durante al menos 15 minutos para formar un complejo de aptámero-diana;
- 10 c) aplicar una exposición cinética seleccionada de (i) añadir una molécula competidora que puede formar un complejo no específico con un aptámero libre; (ii) añadir un diluyente; y (iii) añadir una molécula competidora que puede formar un complejo no específico con un aptámero libre y añadir un diluyente; y
- d) detectar el aptámero en el complejo de aptámero-diana como una indicación de la presencia o la ausencia de dicha diana;
- 15 en el que el aptámero incluye modificaciones de pirimidina en la posición 5.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de obtener una muestra tisular y dividir dicha muestra en una pluralidad de cortes de tejido.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que el aptámero incluye una modificación de pirimidina en la posición 5 seleccionada del grupo que consiste en un resto mostrado en la Figura 14, o una sustitución de desoxiuridina en la posición 5 con un sustituyente seleccionado de: bencil carboxiamida, naftilmetilcarboxiamida, triptaminocarboxiamida o isobutilcarboxiamida.
- 25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la modificación de pirimidina en la posición 5 se selecciona de 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con un control negativo preparado haciendo reaccionar un corte de tejido con una solución como en la etapa b) que carece de dicho aptámero.
- 35 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la exposición cinética comprende añadir una molécula competidora que puede formar un complejo no específico con un aptámero libre.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la molécula competidora comprende un polianión, heparina, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón, ARNt, sulfato de dextrano, poldextrano, polímeros de fosfodiéster abásicos, dNP, pirofosfato, un policatión, espermina, espermidina, polilisina, poliarginina, un aminoácido, arginina, lisina o una combinación de los mismos.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la exposición cinética comprende diluir el aptámero.
- 45 9. El método de acuerdo con 8 en el que la dilución es una dilución 2x, 3x, 4x, 5x o mayor.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en el que la exposición cinética comprende añadir una molécula competidora y diluir el aptámero, en el que la dilución y la introducción del competidor suceden simultáneamente.
- 50 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula diana es indicativa de una patología específica.
- 55 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la diana es indicativa del tipo y el origen de un supuesto tumor.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el aptámero contiene un resto detectable.
- 60 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende:
- 65 i) obtener un espécimen tisular;
- ii) preparar el espécimen tisular fijando un corte del espécimen;
- iii) deshidratar el corte de tejido fijado;

- iv) aclarar el corte de tejido deshidratado;
- v) inmovilizar el corte de tejido aclarado en un portaobjetos de microscopio;
- vi) lavar el corte de tejido inmovilizado; y
- vii) bloquear el corte de tejido lavado.

5

FIG. 1

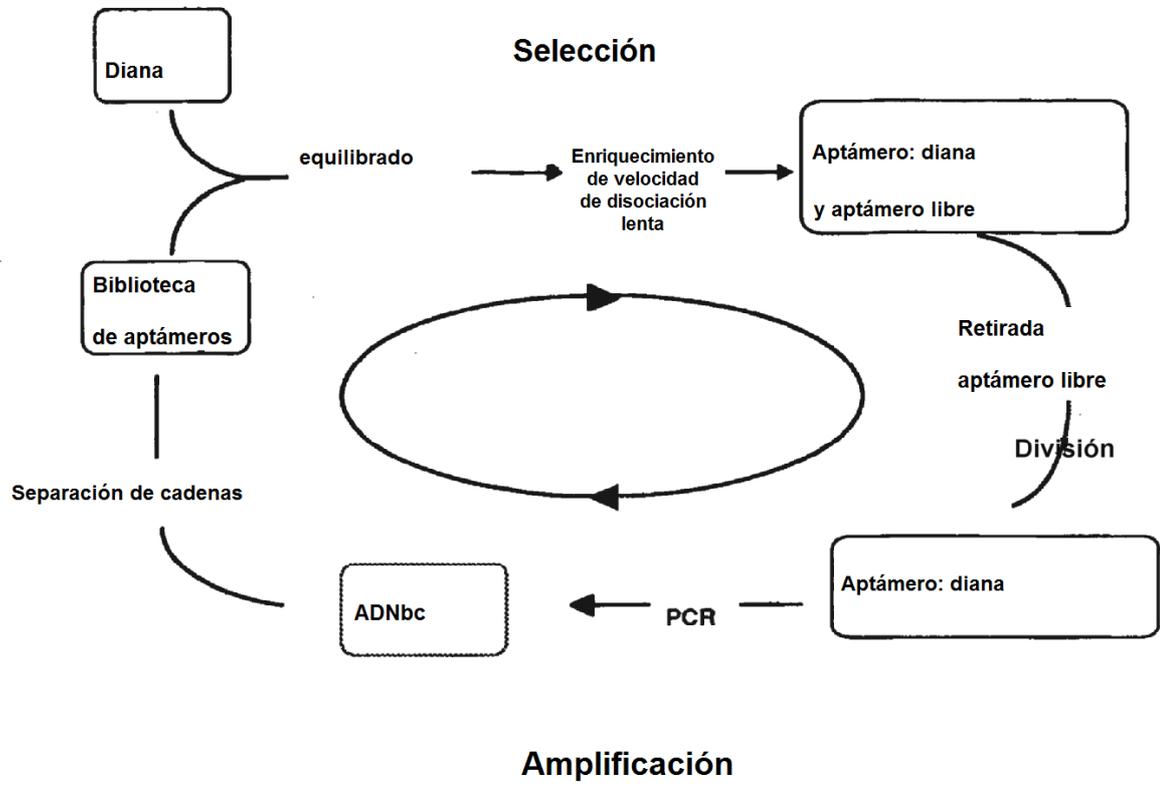
Tinciones de histología

Tinción	Materiales teñidos/Color	Sitio teñido/Color	Notas
Hematoxilina	Ácidos nucleicos/azul; eER/azul	Núcleo/azul	
Eosina	Fibras elásticas/rosa; fibras reticulares/rosa	Citoplasma/rosa; RBC/naranja-rojo; colágeno/rosa	Colorante similar azul de anilina
Azul de toluidina	Gránulos de mastocitos/púrpura	Núcleo/azul; citoplasma/azul; RBC/azul; colágeno/azul	Colorante similar verde metileno
Tinción tricrómica de Masson	Cartílago/azul-verde; fibras musculares/rojo	Núcleo/negro; Citoplasma/rojo-rosa; RBC/rojo; colágeno/azul-verde	
Tinción tricrómica de Mallory	Queratina/naranja; cartílago/azul; matriz ósea/azul oscuro; fibras musculares/rojo	Núcleo/rojo; citoplasma/rojo claro; RBC/naranja; colágeno/azul oscuro	
Tinción elástica de Weigert	Fibras elásticas/azul-negro	Núcleo/azul-negro	
Tinción tricrómica de azan de Heidenhains	Fibras musculares/rojo; cartílago/azul; matriz ósea/azul	Núcleo/rojo-púrpura; citoplasma/rosa; RBC/rojo; colágeno/azul	Distinción de células de los componentes extracelulares
Tinción de plata	Fibras reticulares/marrón-negro; fibras nerviosas/marrón-negro		Fibras reticulares, fibras nerviosas, hongos
Tinción de Wright	Gránulos/púrpura-rosa; gránulos de eosinófilos/rojo brillante-naranja; gránulos basófilos/púrpura oscuro-violeta; gránulos de plaquetas/rojo-púrpura	Núcleo/púrpura azulado; citoplasma/gris azulado; RBC/rojo-rosa	Células sanguíneas
Tinción de Orceína	Fibras elásticas/marrón oscuro; gránulos de mastocitos/púrpura; músculo liso/azul claro	Núcleo/azul oscuro [o rojo]; RBC/rojo brillante; colágeno/rosa	
Tinción de Schiff-ácido periódico (PAS)	Glucógeno y otros carbohidratos/magenta	Núcleo/azul; colágeno/rosa	Membrana basal, carbohidratos
Resistente a ácido	Micobacteria/rojo		
Tinción azul Alcian	Polisacáridos/azul – azul verdoso	Núcleo/negro	Análisis de glucosaminoglucanos
Tinción de Bielschowski	Ovillos neurofibrilares/negro; placas seniles/marrón		

FIG. 1 (continuación)

Rojo Congo	Amiloide/rosa - rojo		Birrefringencia verde manzana
Tinción Azul Luxol Fast	Vaina de mielina/azul-azul púrpura; sustancia Nissl/rojo		
Tinción de Mucicarmina	Mucina epitelial/rojo		
Tinción de hematoxilina ácida fosfotúngstica	Músculo/azul - negro; estrías/marrón oscuro; tejido conectivo/naranja claro a rosa a rojo pardusco; neuroglía de fibrina/azul oscuro; fibras elásticas gruesas/púrpura; cartílago/hueso/rojo amarillento a pardusco		Análisis del SNC
Tetróxido de osmio	Lípidos/negro		
VonGieson	Músculo/amarillo; tejido conectivo/rojo		

FIG. 2



Molde 1

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

(SEQ ID NO:1)

Cebador de PCR directo 1

5'-ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEQ ID NO:2)

Cebador de PCR inverso 1

5'-ABABTTTTTTTTGTCTTCTTGTCGTTTCGC-3' (SEQ ID NO:3)

Molde 2

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

(SEQ ID NO:4)

Cebador de PCR directo 2

5'-ATATATATCCTGCACCCAGTGTCCC-3' (SEQ ID NO:5)

Cebador de PCR inverso 2

5'-ABABTTTTTTTTCCGTCCTCCTCTCCGTC-3' (SEQ ID NO:6)

Oligonucleótido de complemento (His)6

5'-GTCTTCTTGTCGTTTCGC-3' (SEQ ID NO:7)

FIG. 3

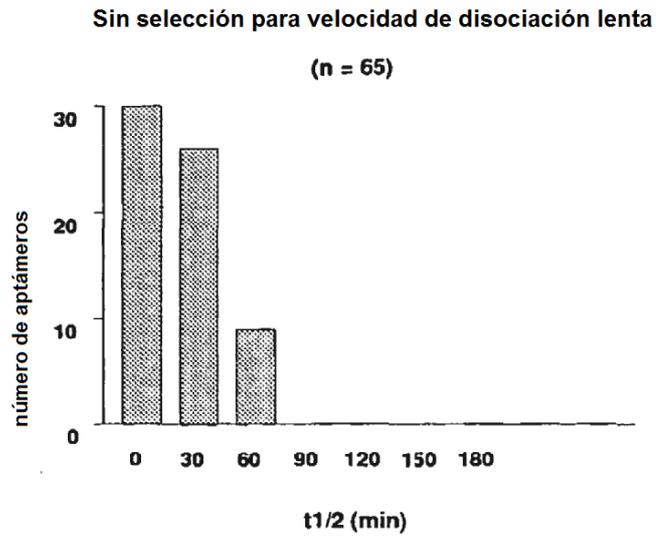
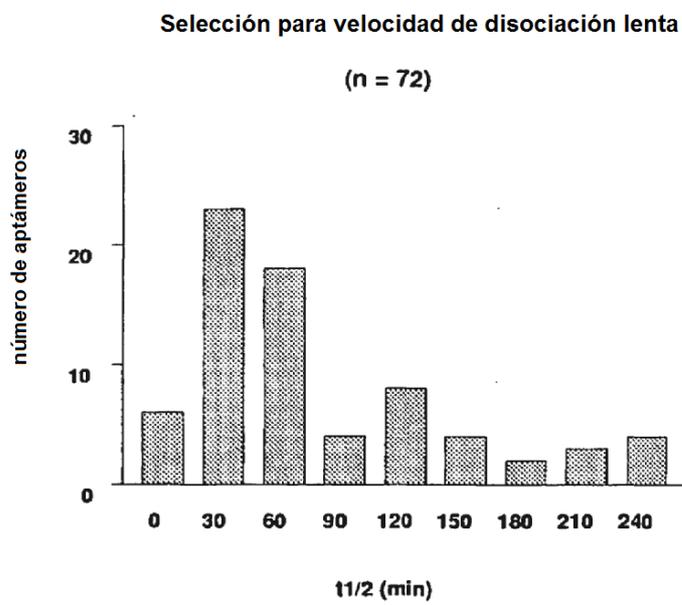


FIG. 4A



Molde 1

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

(SEQ ID NO:8)

Cebador de BrdU directo 1

5'-BrdU - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:9)

Cebador de ANA directo 1

5'- ANA - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:10)

Cebador de AQ directo 1

5'- AQ - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:11)

Cebador de Psor directo 1

5'- Psor - ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:12)

Cebador de PCR directo 1

5'-ATATATATGAGTGACCGTCTGCCTG-3' (SEQ ID NO:13)

Cebador inverso 1

5'-TTTTTTTTCCCGCTCGTCGTCTG-3' (SEQ ID NO:14)

Cebador de PCR inverso 1

5'-ABABTTTTTTTTCCCGCTCGTCGTCTG-3' (SEQ ID NO:15)

FIG. 5A

Molde 2

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

(SEQ ID NO:16)

Cebador de BrdU directo 2

5'- BrdU - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEQ ID NO:17)

Cebador de ANA directo 2

5'- ANA - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEQ ID NO:18)

Cebador de AQ directo 2

5'- AQ - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEQ ID NO:19)

Cebador de Psor directo 2

5'- Psor - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEQ ID NO:20)

Cebador de PCR directo 2

5'-ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEQ ID NO:21)

Cebador inverso 2

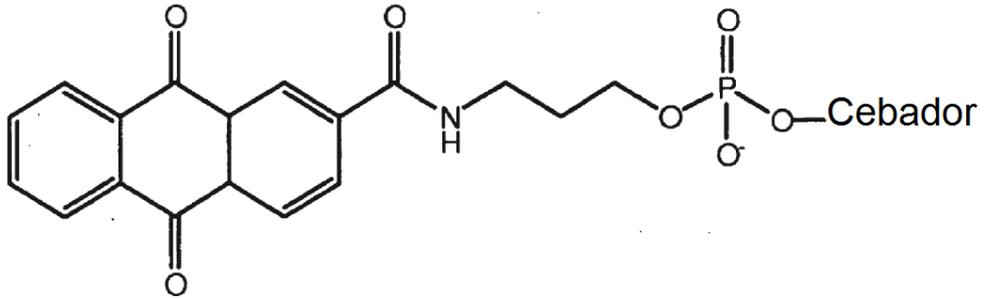
5'-TTTTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEQ ID NO:22)

Cebador de PCR inverso 2

5'- ABABTTTTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEQ ID NO:23)

FIG. 5B

Antraquinona (AQ)



Psoraleno (Psor)

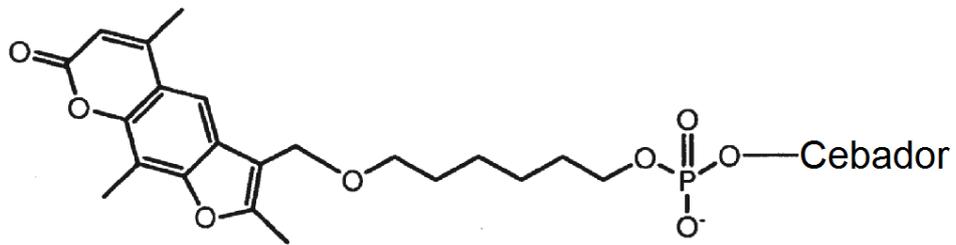
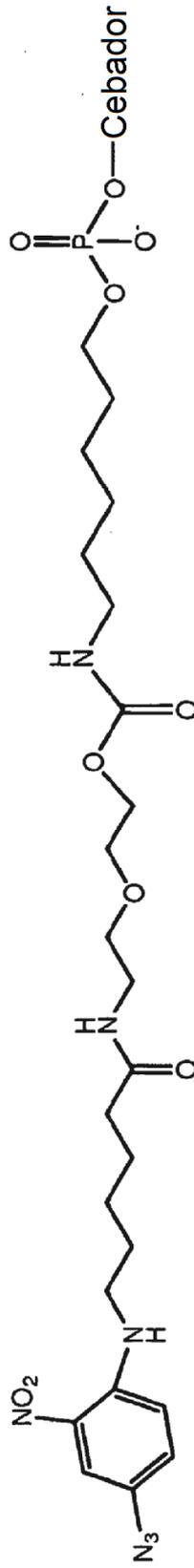


FIG. 6

FIG. 6 Continuación

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



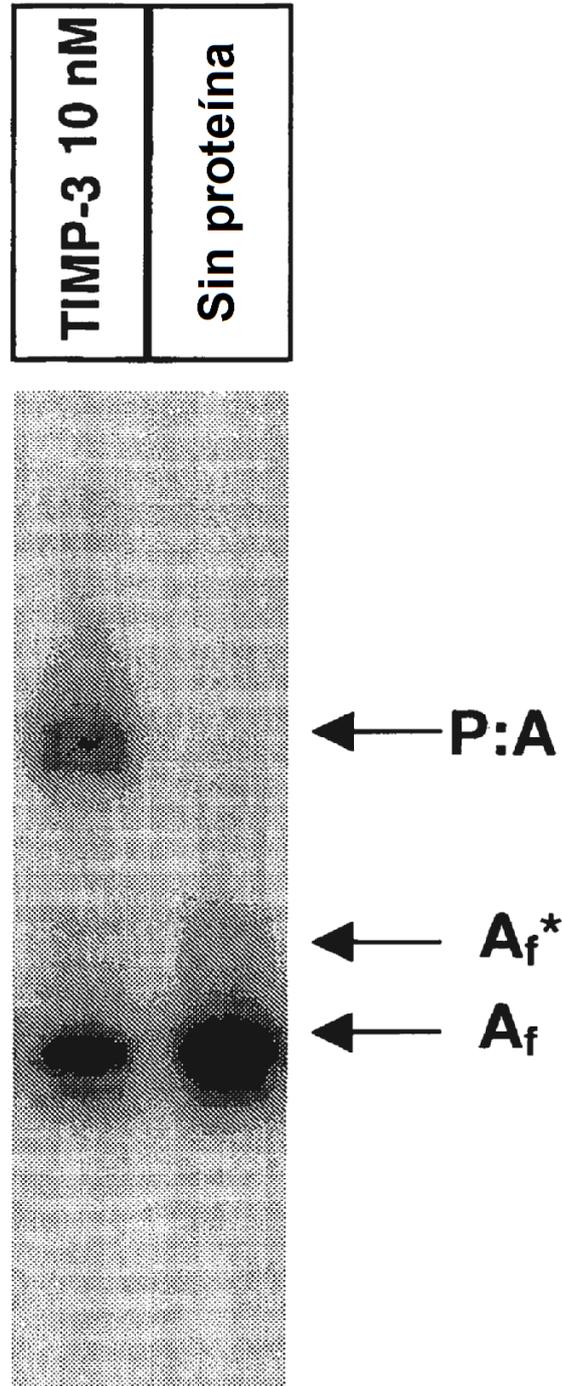


FIG. 7

FIG 8

	Apo E4	BMP RII	Catepsina D
	APRIL	β -NGF	Catepsina G
4-1BB	AREG	Proteoglicano de hueso II	Catepsina S
Ligando de 4-1BB	ARGII	BPI	Catepsina V
6Quina	ARSB	C1q	CCL28
α -1-Antiquimotripsina	ART	C1r	CD5L
α -2-Antiquimotripsina	Artemina	C2	CD22
ACE2	ASAH2	C3	CD23
Proteína C activada	ASAHL	C3a	CD30
Activina A	ATS1	C3adesArg	Ligando de CD30
Activina R1A	ATS13	C3b	ANTÍGENO de CD36
Activina R1B	Aurora quinasa A	C3d	CD39
ADAMTS - 4	Azurocidina	C4	CD97
ASAMTS - 5	B7	C4b	CD109
Agrecano	B7-2	C5	Ceruloplasmina
AIF1	BAFF	C5a	CFC1
ALCAM	BCAM	Complejo de C5b, 6	Chk1
ALK-1	β -Catenina	C6	Ck- β -8-1
Fosfatasa alcalina, hueso	Bcl-2	C7	CK-BB
AMPM2	BCMA	C8	CK-MM
Proteína precursora amiloide	BDNF	C9	Complejo de CLF-1/CLC
Angiogenina	β -Endorfina	Cadherina E	CMP-ácido siálico sintetasa
Angiopoyetina-1	bFGF	Cadherina-5	CNTF
Angiopoyetina-2	bFGF-R	Calcineurina B α	CNTFR alfa
Angiopoyetina-4	BGH3	Calpaina I	CNTN2
ANGL3	β -Glucosidasa	Calpastatina	Factor de coagulación α -XIIa
ANGL4	BGN	Anhidrasa carbónica IV	Factor de coagulación IX
Apo A -1	BLC	Cardiotrofina - 1	Factor de coagulación IXab
Apo B	BMP-7	Caspasa-3 (pro)	Factor de coagulación v
Apo E	BMP-14	Catalasa	Factor de coagulación vII
Apo E2	BMPER	Catepsina A	Factor de coagulación X
Apo E3	BMPIA	Catepsina B	Factor de coagulación Xa

FIG. 8 Continuación

	DL14	FCG2A	GDF -9
	Descarboxilasa Dopa	FCG2B	GDF -11
	DRG -1	FCG3B	GDNF
Factor de coagulación XI	DRR1	FCGR1	GFAP
Factor de coagulación XIa	Dtk	Ferritina	GFR α -1
Factor de coagulación XIII	EDA (A2)	FGF -4	GFR α -2
Colágeno tipo I	EDAR	FGF -5	GFR α -3
COLEC 12	EG - VEGF	FGF -6	GIB
COMMD7	eIF -5	FGF -7	GIIE
Contactina -1	Elastasa	FGF -8B	GITR
Contactina -4	EMAP -2	FGF -9	Receptor glucocorticoide
COX -2	ENA -78	FGF -10	Glutamato carboxipeptidasa
Cripto	Endostatina	FGF -16	Glutación-S-transferasa Pi
CRIS3	Eotaxina	FGF -17	Glipicano 3
CRP	Eotaxina-2	FGF -18	gp130, soluble
CTACK	Eotaxina-3	FGF -19	GPC2
CTGF	Efrina -A4	FGF -20	GPVI
CTLA -4	Efrina -A5	FGFR -2	Granulislina
CXCL 16, soluble	Efrina -B3	Fibrinógeno	Granzima B
Cistatina C	Quinasa de células epiteliales	Fibronectina	Gro - α
Cistaina M	EPO - R	Flt -3	Gro - γ
CYTD	ER	Ligando de Fit-3	Receptor de hormona del crecimiento
CYTF	ERBB1	Fractalquina/CX3CL -1	GSK - 3 beta
CYTN	ERBB2	FSH	GV
Citocromo C	ERBB3	FST	GX
Citocromo P450 3A4	ERBB4	FYN	HAI -1
DAN	ERK - 1	Proteína GA733 -1	Haptoglobina, tipo de mixto
DARPP-32	ESAM	Galectina -2	Hat 1
DC - SIGN	Factor B	Galectina -3	HB -EGF
DC - SIGNR	Factor D	Galectina -4	HCC -1
D - dímero	Factor H	Galectina -7	HCC -4
DEAD - proteína 19B de caja	Factor I	GAS1	HDAC8
Desmogleina-1	Ligando de Fas, soluble	GASP -2	Hemopexina
DKK1	Fas, soluble	G-CSF-R	

FIG. 8 Continuación

	IGFBP -4	IL - 17 sR	Layilina
	IGFBP -5	IL - 17B	LBP
	IGFBP -6	IL - 17D	LD78-beta
Cofactor de heparina II	IGFBP -7	IL - 17E	Leptina
HGF	IGF - I	IL - 17F	Lipocalina 2
Histona H 1.2	IGF - I sR	IL - 18 Bpa	LKHA4
HIV -2 Inv	receptor de IGF - II	IL - 18 R α	LRIG3
HMG -1	IgM	IL - 18 R β	LRP8
HO -2	IL - 1 β	IL - 19	LSAMP
HPLN1	IL - I R AcP	IL - 20	Hormona luteinizante
HPV E7 Tipo 16	IL - 1 R4	IL - 21 sR	LY86
HPV E7 Tipo 18	IL - 1 sRI	IL - 22	LY9
HSP 60	IL - 1F7	IL - 27	Linfotactina
HSP 70	IL - 1Rrp2	Inosina trifosfatasa	Linfotoxina β R
HSP 90 α	IL - 2	IP -10	Lisozima
HSP 90 β	IL - 2 sR γ	IR	LYVE 1
HTRA2	IL - 4	I - TAC	Receptor de manosa de macrófago
HVEM	IL - 4 sR	JAM - B	MAPK14
I11RA	IL - 6	JAM - C	MATN2
I12R2	IL - 6 sR γ	Caliceína 4	MATN3
I-309	IL - 7	Caliceína 5	MBL
IC3b	IL - 7 R alfa	Caliceína 8	MCP -1
ICOS	IL - 8	Caliceína 11	MCP -2
IDE	IL - 10	Caliceína 12	MCP -3
IDS	IL - 10 R β	Caliceína 13	MCP -4
IDUA	IL - 11	Carioferina - α 2	M-CSF R
IFN - γ	IL - 12	Quiminógeno, APM, cadena sencilla	MDC
IFN - γ R1	IL - 12R β 1	Quiminógeno, APM, dos cadenas	MEK1
IFN - lambda 1	IL - 13	KLH	MEPE
IFN - lambda 2	IL - 13 R α 1	KREM2	MER
IgE	IL - 13 R α 2	Ku70	Met
IGFBP-1	IL - 15 R α	Lactoferrina	METAP1
IGFBP -2	IL - 16	LAG -1	MIA
IGFBP -3		Laminina	MICA

FIG. 8 Continuación

	Neurotrofina -5	PKC- α	SAP
	NG36	PKC- β -II	SARP-2
	Nidógeno	PKC-D	sCD14
Midkina	NKG2D	PKC- ζ	SCF sR
Mifgd, ratón	NKp30	Plasmina	SCGF - α
MIG	NKp44	Plasminógeno	SCGF - β
Miox, Rata	Nogina	PIGF	Semaforina 3A
MIP -1 α	Receptor de Nogo	Precalicerina	sE-Selectina
MIP -1 β	NovH	PRL	SET9
MIP -3 α	NPS - PLA2	Properdina	sFRP-3
MIP -3 β	NRP1	Fosfatasa ácida prostática	sICAM-2
MK01	OLR1	Proteasa nexina 1	sICAM-3
MMP -1	ON	Proteína C	SIGIR R
MMP -2	OPG	Proteína S	Siglec-6
MMP -3	OSM	Protrombina	Siglec -7
MMP -7	Ligando de ON40	PSA	Siglec -9
MMP -8	subunidad beta PAFAH	PSA-ACT	SLAMF 8
MMP -9	PAI -1	P-Selectina	sLeptina R
MMP -13	PAPP - A	PSMA	SLPI
MMP -14	PARC	PTHrP	sL-Selectina
MMP -17	Proteína compañera A	PTN	SMAC
MOZ	Proteína compañera B	PTP-1 B	so-1,2-Diacilglicerol quinasa
MP 112	P-Cadherina	Factor β de disociación de GDP Rab	SOD
MPIF -1	PCNA	Rac1	Soggy - 1
MSP R	PDGF Rb	RAD51	Soaic Hedgehog
Mieloperoxidasa	PDGF -AA	RANTES	SPIN T2
Cadena ligera reguladora de miosina 2	PD-L2	RAP	Espondina-1
NADPH - P450 Oxidorreductasa	PDPK1	RELT	sRage
NANOG	PECAM-1	Resistina	sRANKL
NAP -2	Persefina	RET	sTie-1
NCAM -L1	PF-4	RGMB	sTie-2
NET4	PGRP-S	RGM-C	sTREM-1
NEURREGULINA-1	PIGR	S100A4	STX1 α
Neurotrofina -3	PKB		

FIG. 8 Continuación

	Trombina	Transferrina	ULBP-3
	Globulina de unión a tirosina	TrATPasa	uPA
	TIG2	TrkB	URB
Sulotransferasa, factor Nod	TMMP-1	TrkC	VCAM-1
SuPar	TMMP-2	Troponina I	VEGF
TAC1	TMMP-3	Troponina T	VEGF sR2
TARC	TNF sR-1	Tripsina	VEGF sR3
tau	TNF sR-II	Tripsina 2	Vitronectin
TBP	TNFSF 15	TSLP	vWF
TECK	TNFSF 18	TSLP R	WFKN2
Tenascina	Tom34	TSP2	WIF-1
Testicano-2	Topoisomerasa	TSP4	WISP-3
TF	tPA	TWEAK	XEDAR
TFPI	Tpo	UBC9	Yes
TGF -β1	TRAIL	Ubiquitina +1	
TGF -β2	TRAIL R2	ULBP-1	
TGF -β RIII	TRAIL R4	ULBP-2	

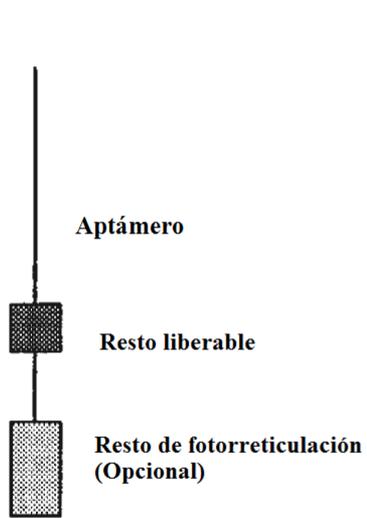


FIG. 9A

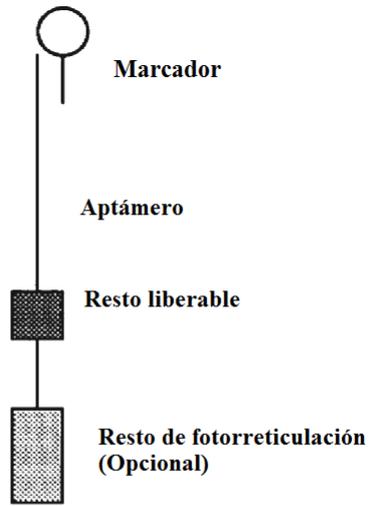


FIG. 9B

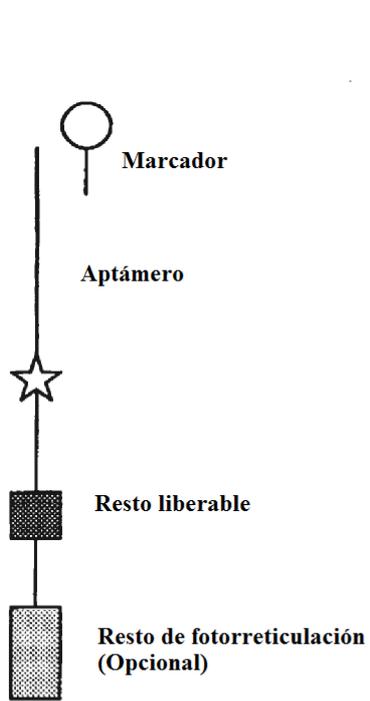


FIG. 9C

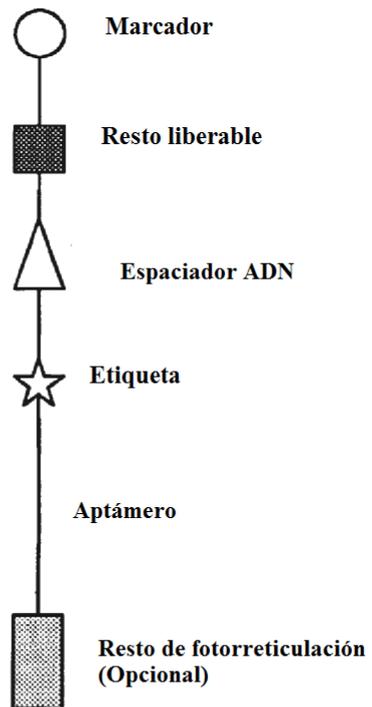
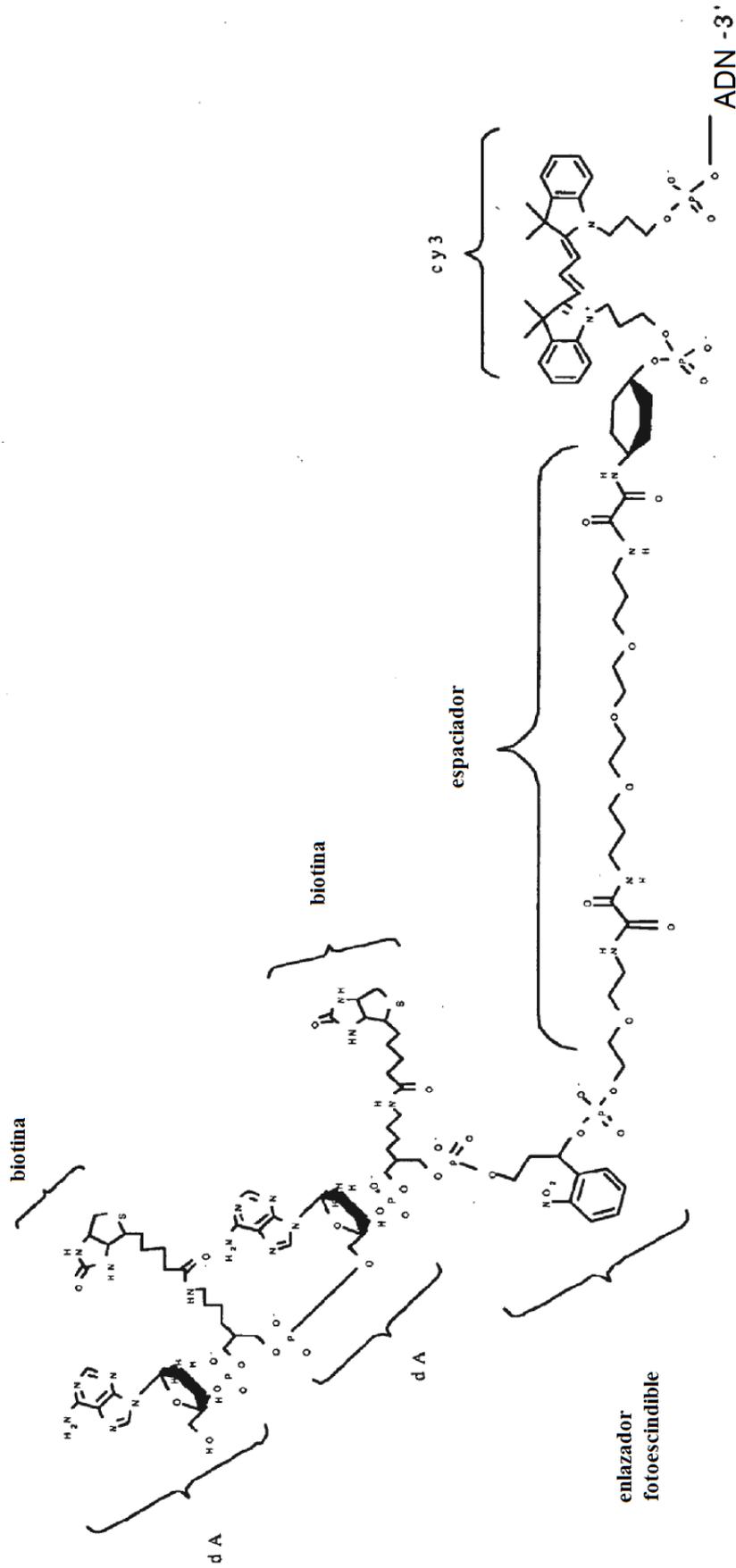


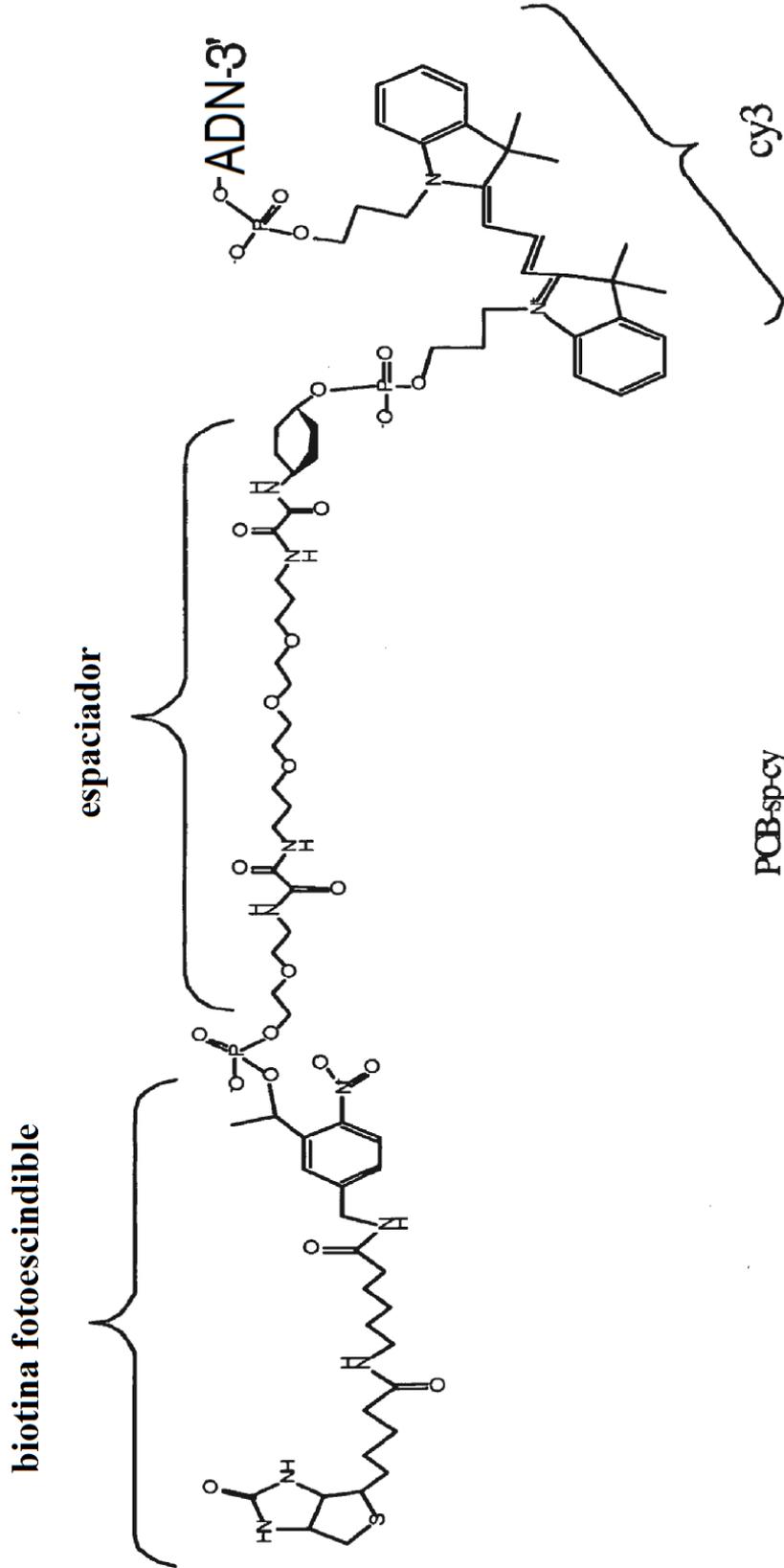
FIG. 9D



Peso molecular: 2900,69

(AB)2-P-sp-cy

FIG. 10A



Peso molecular: 1729,78

FIG. 10B

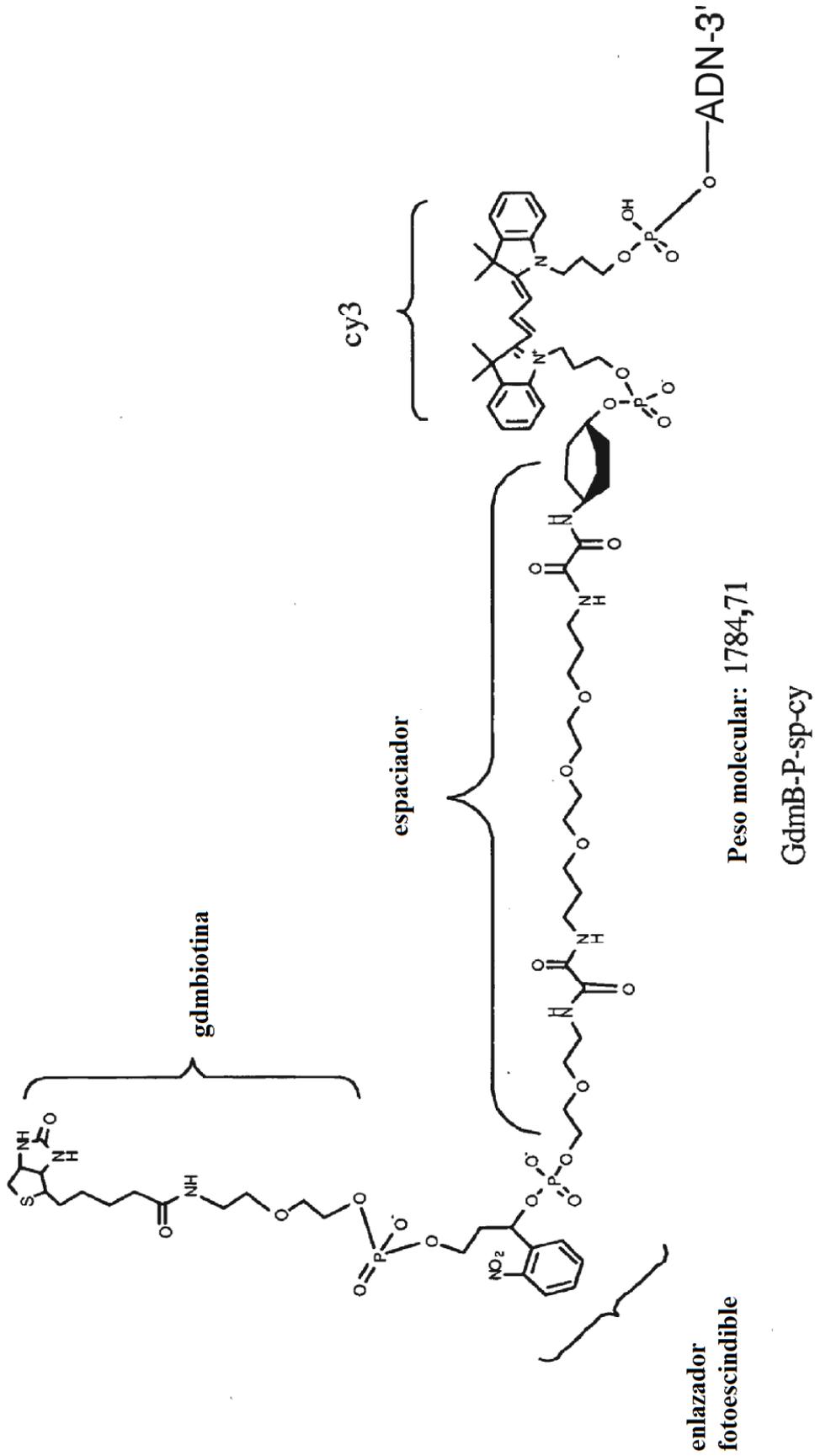
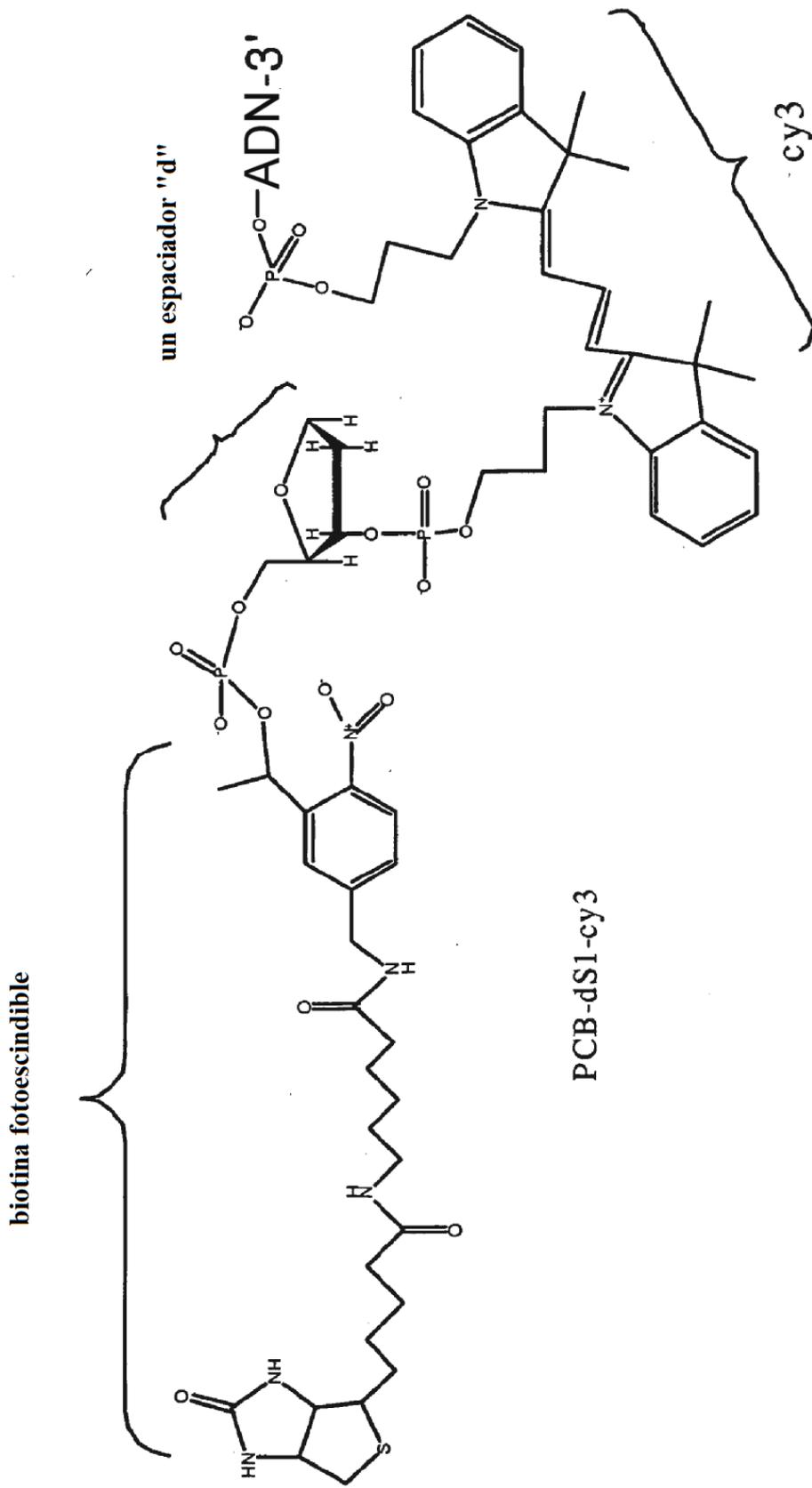
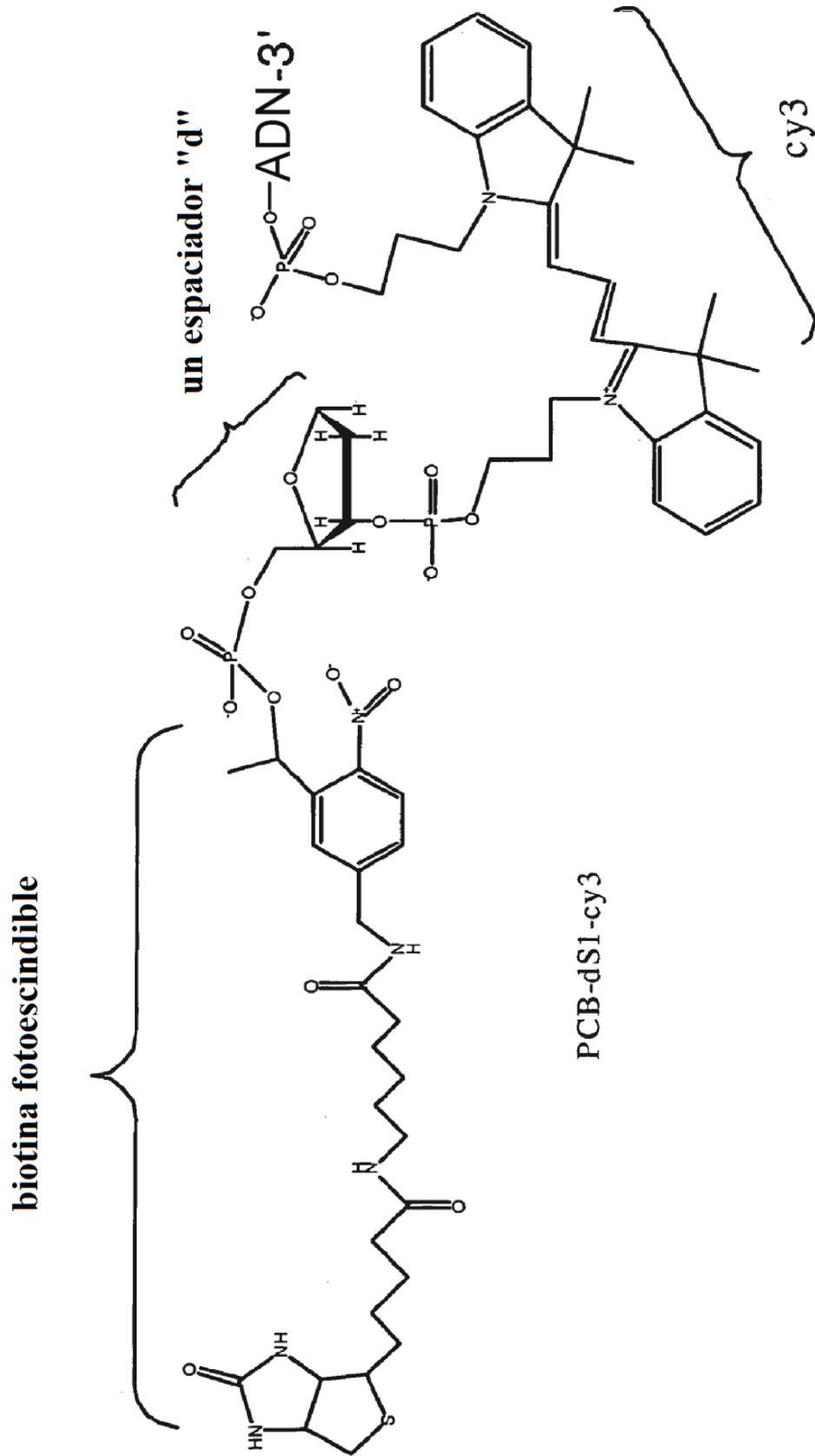


FIG. 10C



Peso molecular: 1299,28

FIG. 10D



Peso molecular: 1299,28

FIG. 10E

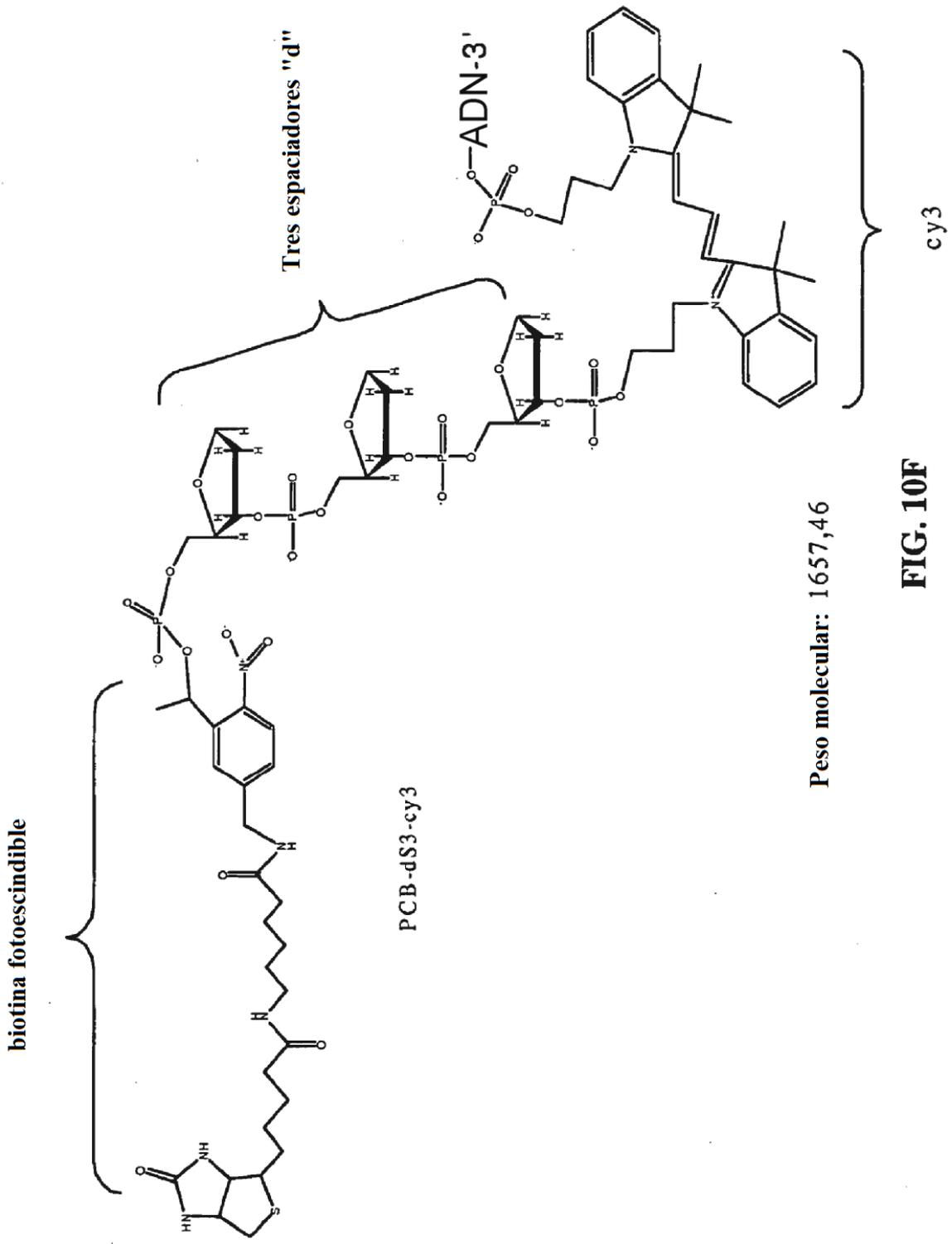


FIG. 10F

FIG. 11

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. 12A

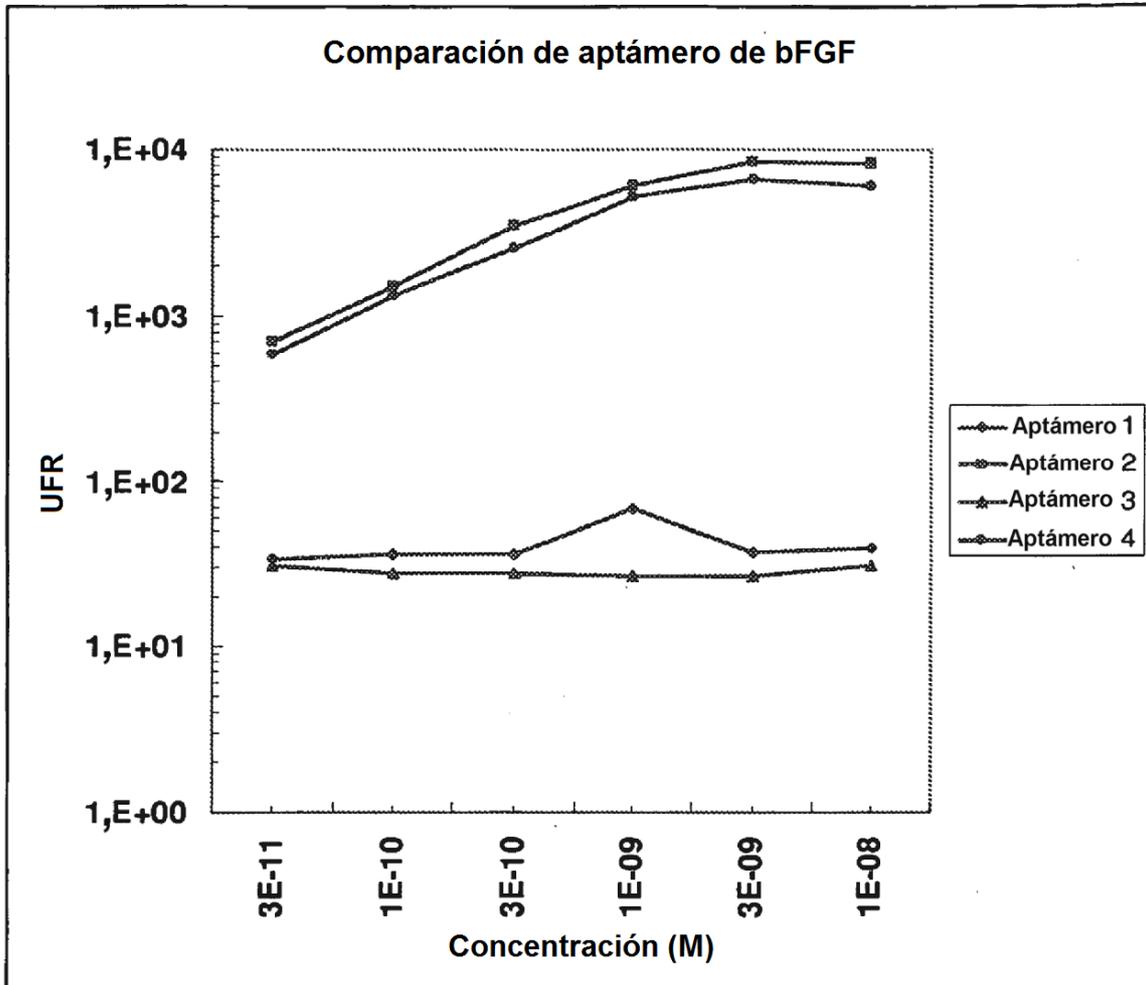


FIG. 12B

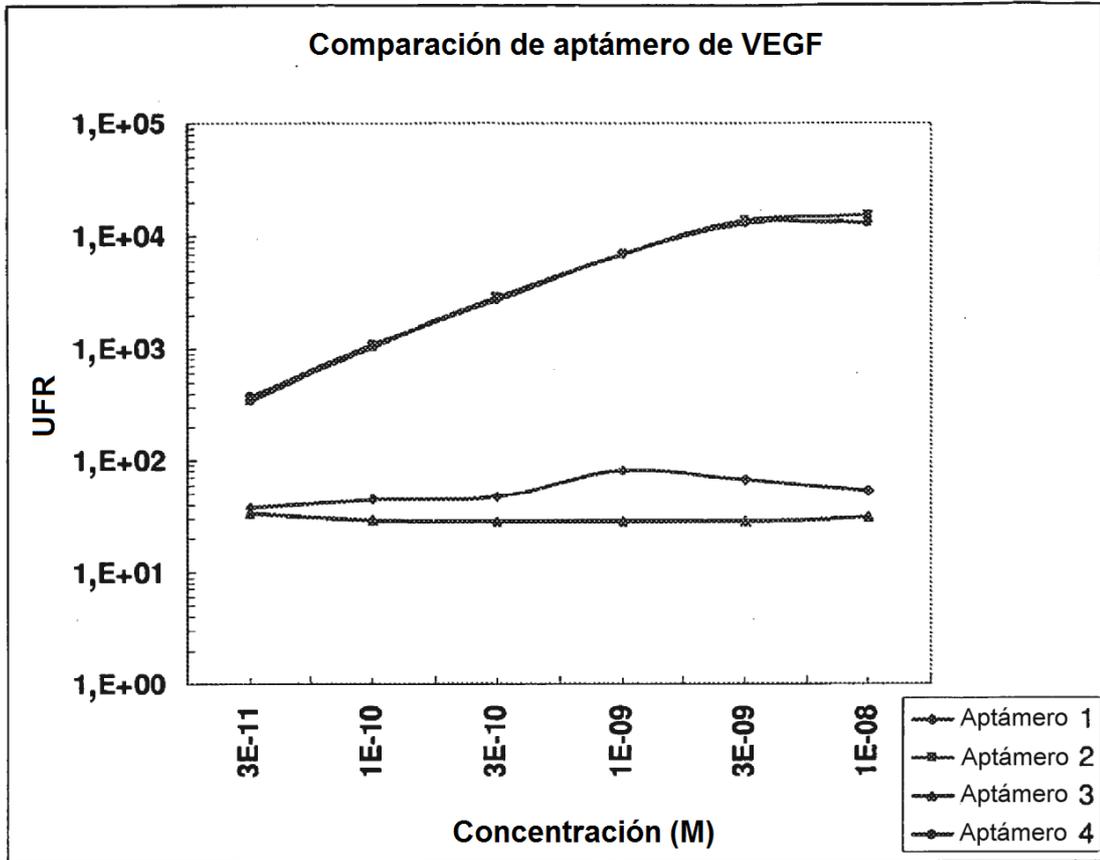


FIG. 12C

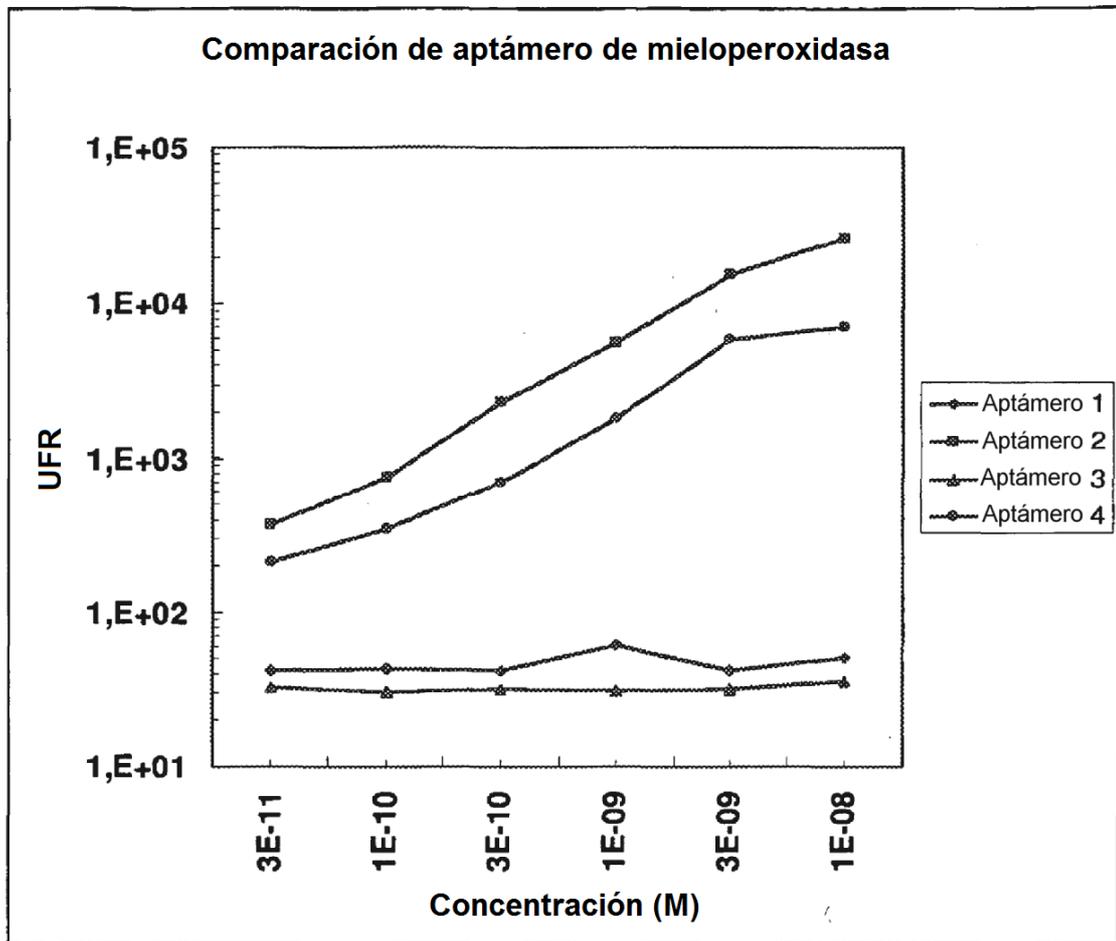


FIG. 13A

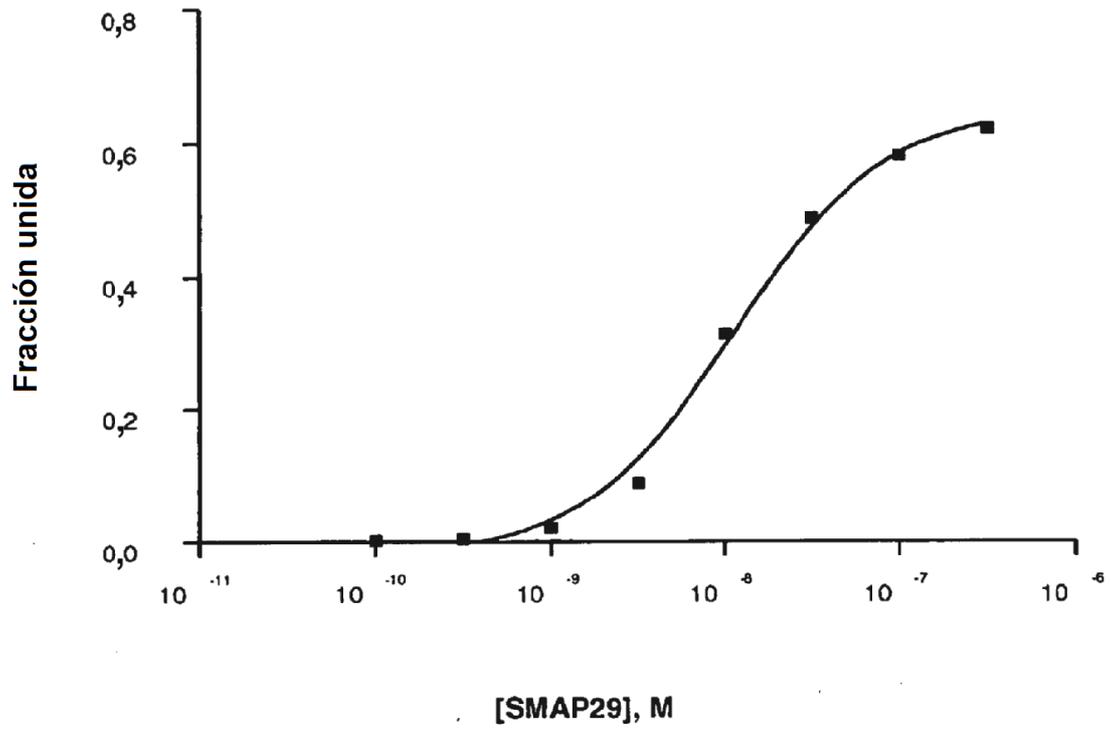


FIG. 13B

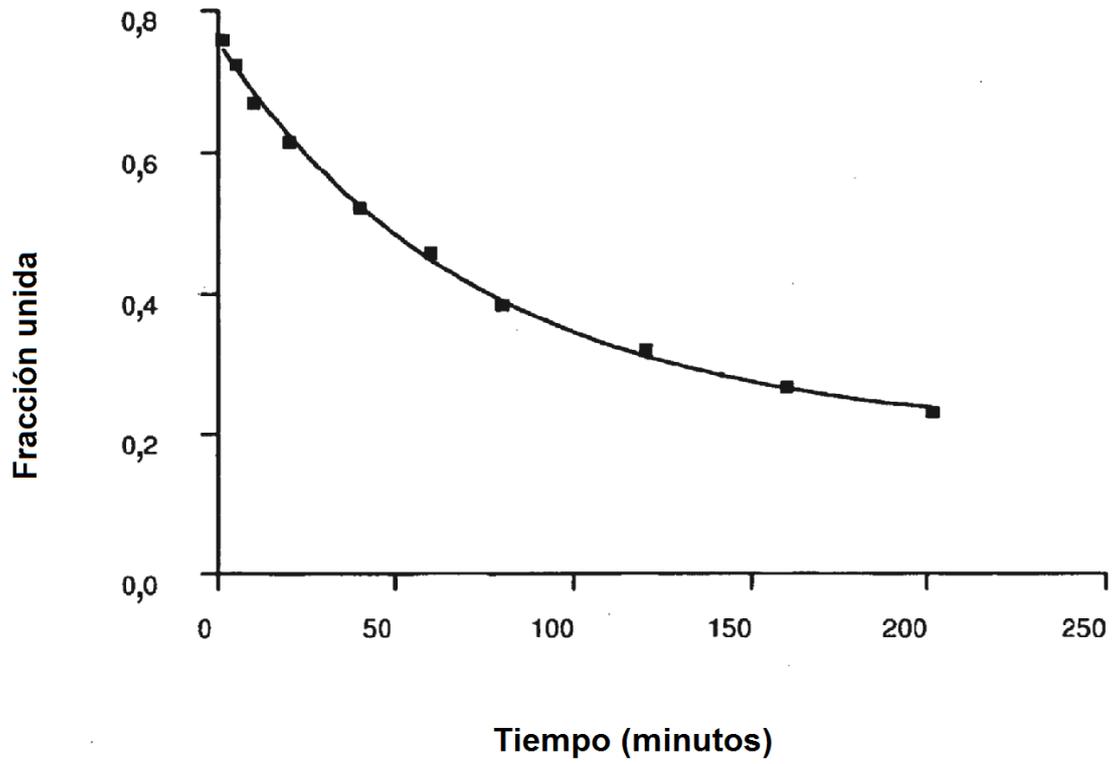


FIG. 14 Continuación

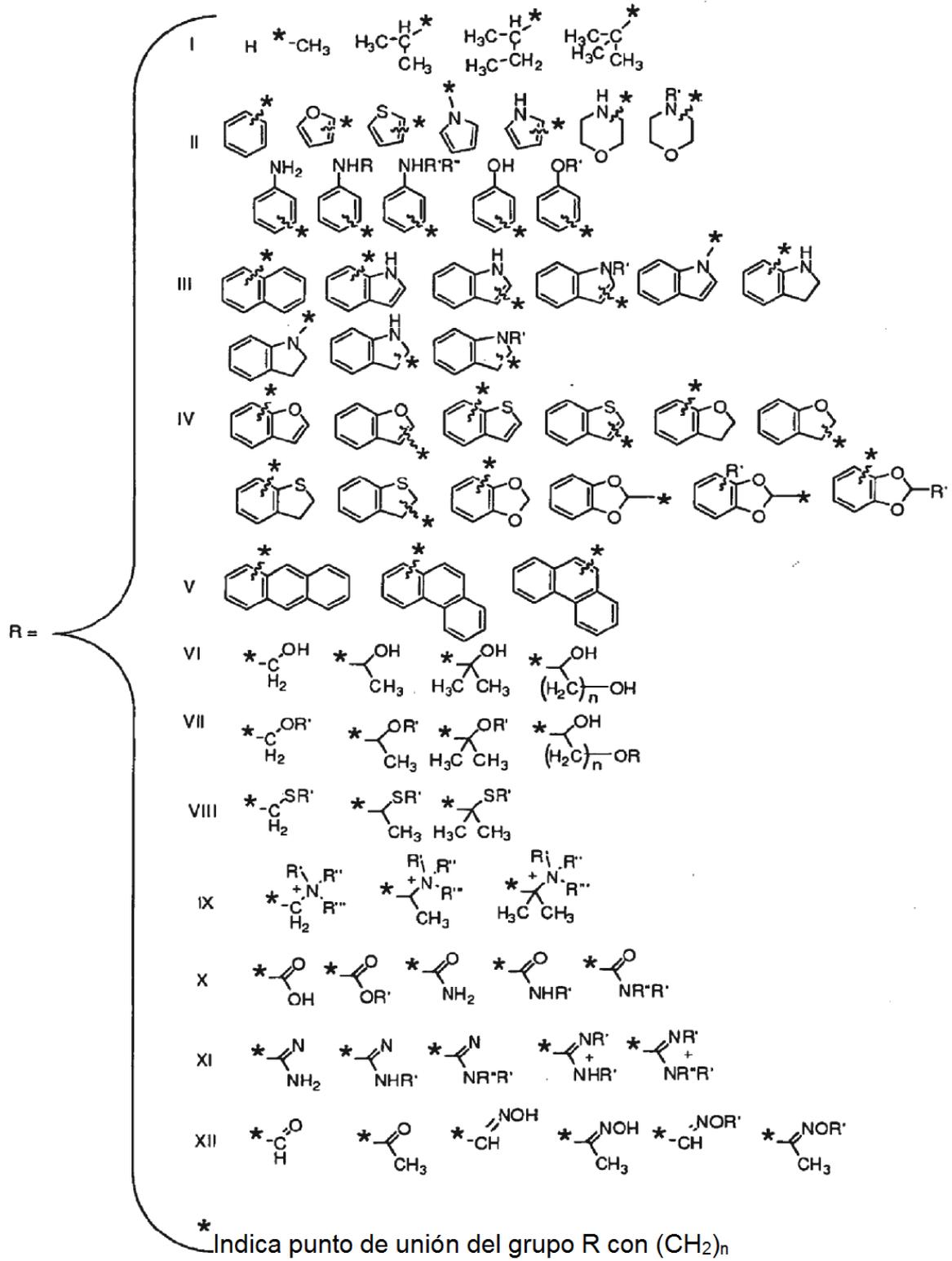


FIG. 15

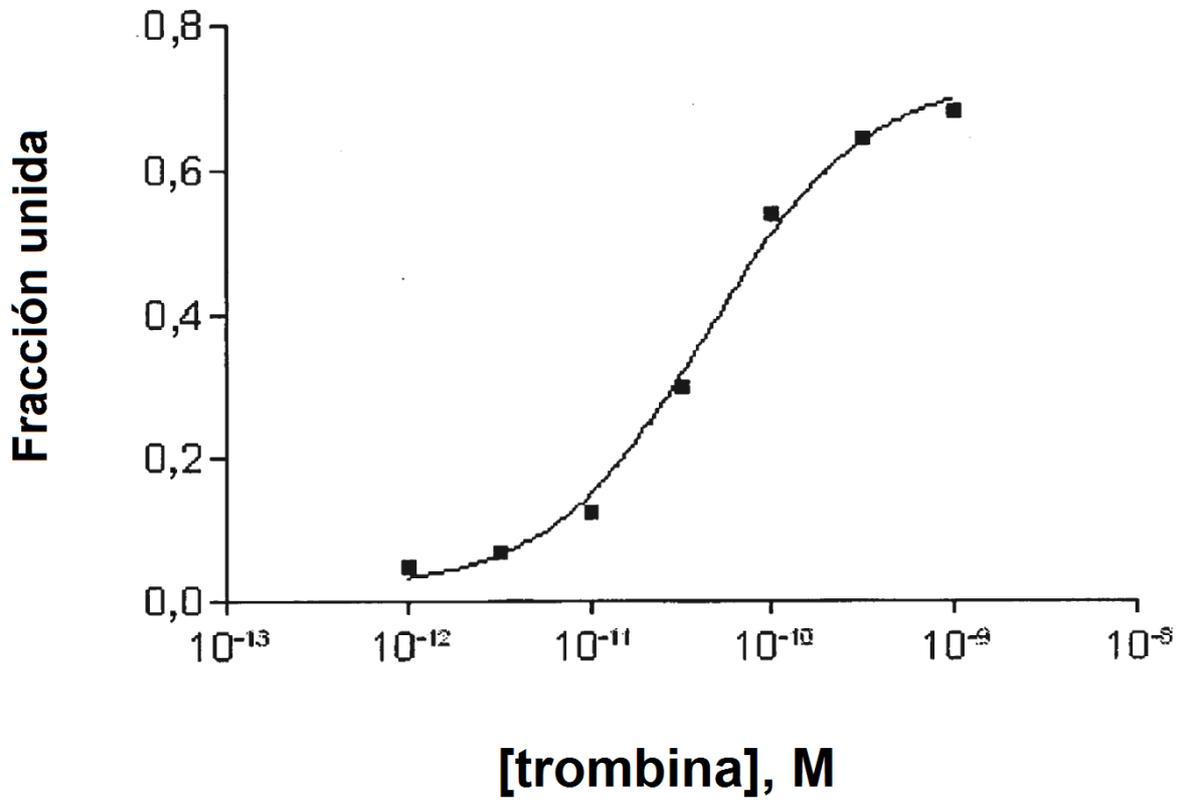


FIG.16

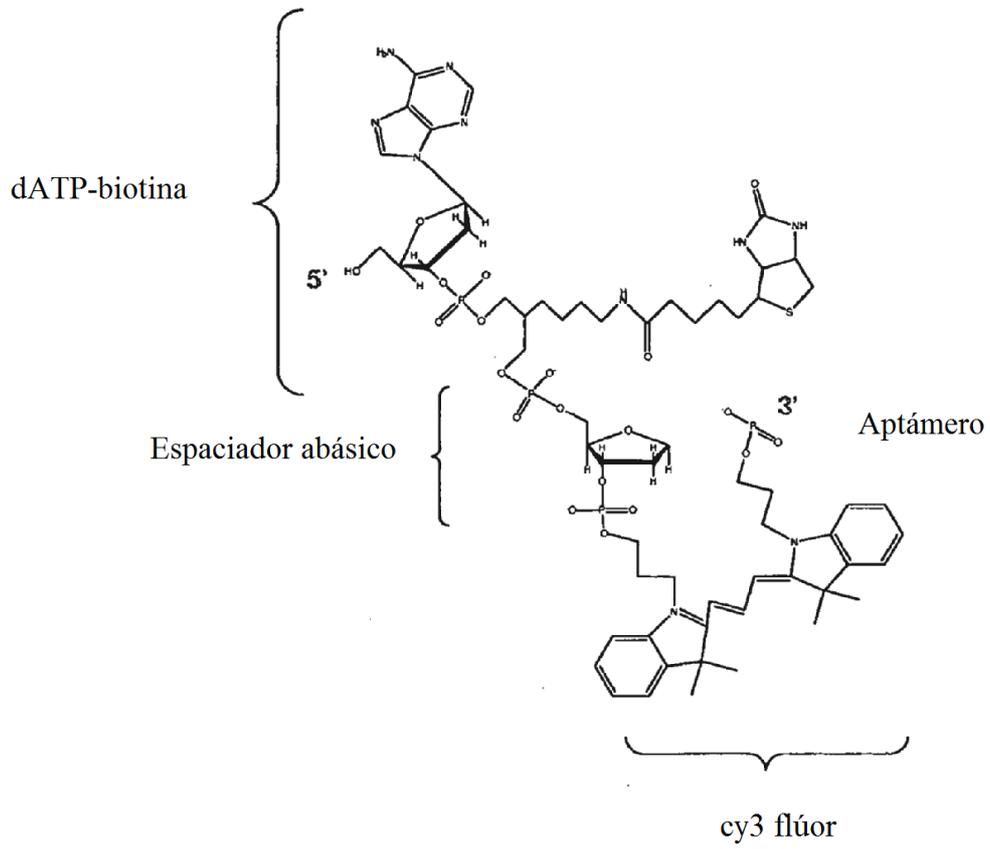


FIG.17A

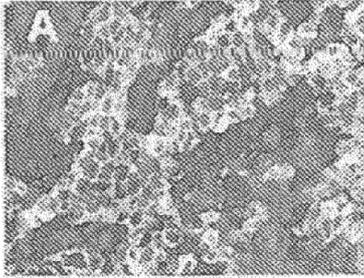


FIG.17B

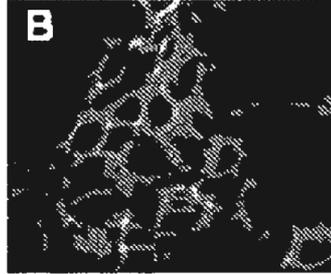


FIG.17C

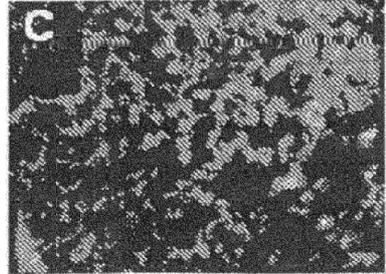


FIG.18A

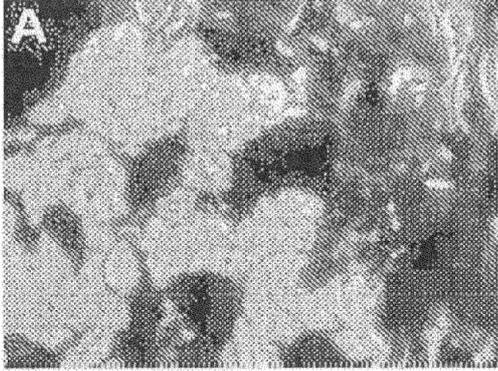


FIG.18B

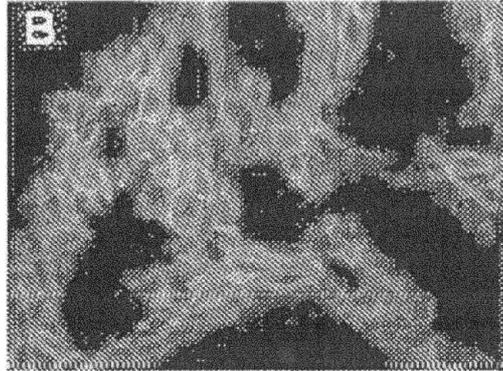


FIG.19A

FIG.19B

FIG.19C

FIG.19D

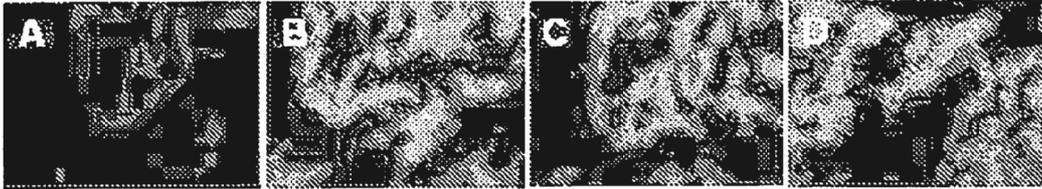


FIG.20A

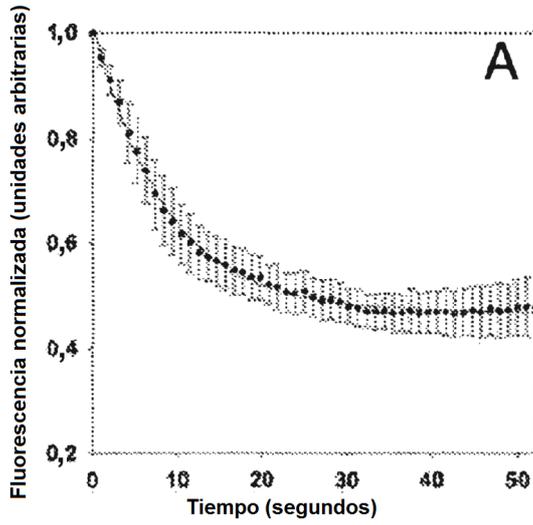
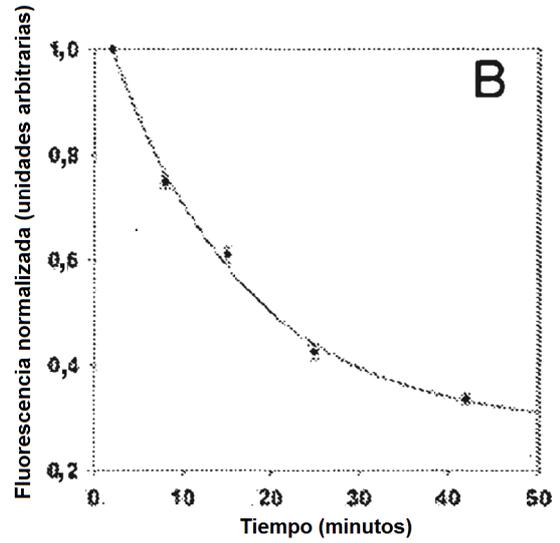


FIG.20B



Fluorescencia nuclear a medida que se disocia HER2 SOMAmero en presencia en SD 1 mM; los datos mostrados son la media +/- DT para n = 5 núcleos, incluyendo el ajuste de curva de regresión no lineal. Se muestra cada quinto punto temporal para mayor claridad. B) Fluorescencia membranosa a medida que se disocian SOMAmeros en presencia de SD 1 y HER2 SOMAmero no fluorescente 100 nM; los datos son la media +/- DT para n = 5 regiones de interés, incluyendo el ajuste de curva de regresión no lineal

FIG.21A

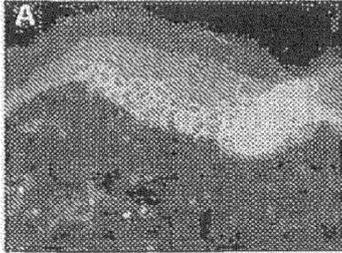


FIG.21B

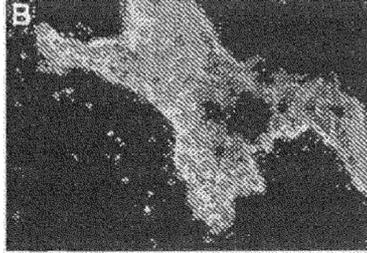


FIG.21C



FIG.22A

FIG.22B

FIG.22C

FIG.22D

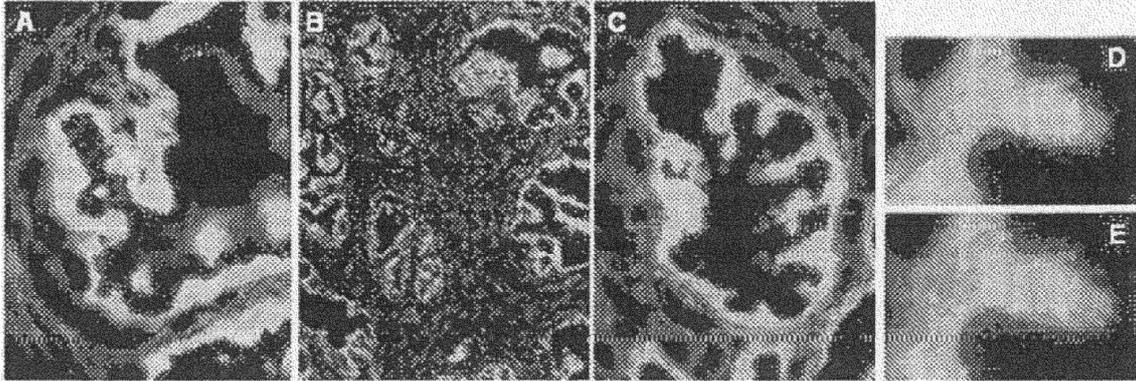


FIG.22E