

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 587**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2008 E 15152547 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2933340**

54 Título: **Aptámeros con uridinas y/o timidinas sustituidas en la posición 5 con un grupo bencilo**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2017

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 y
GOLD, LARRY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 647 587 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aptámeros con uridinas y/o timidinas sustituidas en la posición 5 con un grupo bencilo

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere en general a métodos para la generación de aptámeros y fotoaptámeros que tienen mejores propiedades y los aptámeros y fotoaptámeros mejorados que se generan de esta manera. En particular, la presente divulgación describe aptámeros con una tasa de disociación lenta que son altamente
10 específicos para una diana de interés. La divulgación describe la composición de estos aptámeros con una tasa de disociación lenta así como los métodos para su selección. Además la divulgación describe construcciones de aptámeros con mejores funcionalidades para los métodos de detección. Además, la divulgación describe aplicaciones habilitadas para estos aptámeros mejorados.

15 **Antecedentes**

La siguiente descripción proporciona un resumen de información relevante para la presente divulgación y sin que sea una concesión de que cualquier información proporcionada o las publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento sean anteriores a la invención reivindicada.

20 El procedimiento SELEX es un método para la selección *in vitro* de moléculas de ácido nucleico que son capaces de unirse a moléculas diana con una alta especificidad y se describe en la Patente de EE. UU. Nº 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands" y la Patente de EE. UU. Nº 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulada "Nucleic Acid Ligands" cada una de las cuales se incorpora específicamente por referencia en el presente
25 documento. Estas patentes, que se denominan colectivamente en el presente documento Patentes SELEX, describen métodos para fabricar un aptámero para cualquier molécula diana deseada.

El procedimiento SELEX básico se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 5.707.796, titulada "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure", describe el
30 uso del procedimiento SELEX en conjunción con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como el ADN doblado. La Patente de EE. UU. Nº 5.580.737, titulada "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine", describe un método para identificar aptámeros altamente específicos capaces de discriminar entre moléculas estrechamente relacionadas, llamado Contra-SELEX. La Patente de EE. UU. Nº 5.567.588, titulada "Systematic Evolution of Ligands
35 by Exponential Enrichment: Solution SELEX", describe un método basado en SELEX que consigue una separación altamente eficaz entre oligonucleótidos que tienen una alta o baja afinidad por una molécula diana. La Patente de EE. UU. Nº 5.496.938, titulada "Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev", describe métodos para obtener aptámeros mejorados después de que se haya llevado a cabo el SELEX. La Patente de EE. UU. Nº 5.705.337, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX", describe métodos para unir
40 covalentemente un aptámero a su diana.

El procedimiento SELEX engloba la identificación de aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando, tales como una mejor estabilidad *in vivo* o unas mejores características de suministro. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en la
45 ribosa y/o el fosfato y/o las posiciones de las bases. Los aptámeros identificados por el procedimiento SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en la Patente de EE. UU. Nº 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de las pirimidinas. La Patente de EE. UU. Nº 5.580.737, véase *supra*, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos
50 modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F), y/o 2'-O-metil (2'-OMe).

Se describen otras modificaciones del procedimiento SELEX en la Patente de EE. UU. Nº 5.763.177, Patente de EE. UU. Nº 6.001.577, y Patente de EE. UU. Nº 6.291.184, cada una de las cuales se titula "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX";
55 véase también, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands". Estas patentes, a las que se denomina colectivamente "Las patentes FotoSELEX", describen varios métodos SELEX para seleccionar aptámeros que contienen grupos funcionales fotorreactivos capaces de unirse y/o fotoentrecruzarse con y/o fotoinactivar una molécula diana. Los aptámeros fotorreactivos resultantes se denominan aptámeros de fotoentrecruzamiento o fotoaptámeros.

60 Eaton et al. (1997), *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 15, nº 6, pp. 1087-1096 proporciona métodos para la optimización combinatoria de aptámeros siguiendo el SELEX, y desvela uridinas modificadas con un sustituyente benzoilo en la posición 5. Además, la Patente de EE. UU. Nº 5.945.527 desvela la síntesis química de nucleósidos modificados, incluyendo pirimidinas modificadas por un sustituyente benzoilo en la posición 5.

65 Aunque estos procedimientos SELEX y fotoSELEX son útiles, siempre se necesitan procedimientos que den lugar a aptámeros con propiedades mejoradas que se generen por técnicas de selección *in vitro*. Por ejemplo, existe una

necesidad de aptámeros contra moléculas diana con mejores afinidades de unión que las que se alcanzan con los nucleótidos ADN o ARN de origen natural, así como métodos para producir dichos aptámeros. Para muchas aplicaciones, tales como por ejemplo, ensayos *in vitro*, diagnósticas, terapéuticas, o aplicaciones de diagnóstico por imagen, es interesante producir aptámeros con tasas de disociación lentas del complejo de afinidad aptámero/diana.

5 Se han propuesto varias técnicas para producir dichos reactivos (véase por ejemplo, los documentos WO99/27133 y US2005/0003362). Sin embargo, estos procedimientos de selección no discriminan entre la selección de reactivos que tienen cinéticas de asociación con la diana rápidas (es decir, tasas de asociación rápidas) y la selección de reactivos que tienen cinéticas de disociación con la diana lentas (es decir, tasas de disociación lentas). Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos procedimientos y técnicas que favorezcan la selección de aptámeros con tasas de disociación lentas a la vez que se inhibe la selección de aptámeros que simplemente tienen una tasa de asociación rápida con la diana.

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

Sumario

20 La invención es como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación describe nuevos aptámeros, y métodos para producir y utilizar dichos aptámeros. En particular, la divulgación describe aptámeros con una tasa de disociación lenta (tasa lenta de disociación), aptámeros con una tasa de disociación lenta que contienen pirimidinas modificadas en C-5, y procedimientos para la selección de aptámeros con una tasa de disociación lenta por dilución, por adición de un competidor, o por combinación de ambas estrategias. Además, se describen aptámeros con una tasa de disociación lenta de varias dianas tales como proteínas y péptidos. También se describen aptámeros con una tasa de disociación lenta con características estructurales y temperaturas de fusión únicas. La divulgación también describe aptámeros con una tasa de disociación lenta con grupos funcionales fotorreactivos, aptámeros que son refractarios a la presencia de materiales poli-aniónicos, y un procedimiento de selección para estos aptámeros, así como aptámeros construidos con otras varias funcionalidades para mejorar su utilidad en varias aplicaciones.

35 La presente divulgación describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que son capaces de unirse a moléculas diana. Más específicamente, la presente divulgación describe métodos para producir aptámeros y/o fotoaptámeros que tienen tasas de disociación más lentas de sus moléculas diana respectivas que los aptámeros y fotoaptámeros que se obtienen con los métodos SELEX anteriores. En general, tras poner en contacto la mezcla de candidatos con la molécula diana y permitir que se produzca la formación de complejos ácido nucleico-diana, se introduce un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta en el que los complejos ácido nucleico-diana con tasas de disociación rápida se disociarán y no se vuelven a formar, mientras que los complejos con tasas de disociación lentas permanecerán intactos. Los métodos para introducir un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta incluyen, pero no se limitan a la adición de moléculas competidoras a la mezcla de ácidos nucleicos y moléculas diana, la dilución de la mezcla de ácidos nucleicos y moléculas diana, o una combinación de ambas. La divulgación describe además aptámeros y fotoaptámeros que se obtienen utilizando estos métodos.

45 En una disposición, el método comprende la preparación de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos; poner en contacto la mezcla de candidatos con una molécula diana, formando complejos ácido nucleico-diana; introducir un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta para inducir la disociación de los complejos ácido nucleico-molécula diana con tasas de disociación relativamente rápidas; separar los complejos ácido nucleico-molécula diana que permanecen unidos y los ácidos nucleicos libres en la mezcla de candidatos; e identificar los ácidos nucleicos que estaban unidos a la molécula diana. El procedimiento puede además incluir la etapa repetitiva de amplificación de los ácidos nucleicos que se unen a la molécula diana para obtener una mezcla enriquecida de ácidos nucleicos con ácidos nucleicos que se unen a la molécula diana produciendo aún más complejos ácido nucleico-molécula diana que tienen tasas de disociación lentas.

55 En otra disposición, la mezcla de candidatos de ácidos nucleicos incluye ácidos nucleicos que contienen bases de nucleótidos modificadas que pueden ayudar a la formación de complejos ácido nucleico-molécula diana que tengan tasas de disociación lentas. Los métodos mejorados para llevar a cabo el SELEX con nucleótidos modificados, que incluyen nucleótidos que contienen grupos fotoactivos u otros grupos funcionales, o nucleótidos que contienen sitios de sustitución para grupos fotoactivos se desvelan en la Solicitud de EE. UU. Serie Nº 12/175.388, presentada el 17 de julio de 2008 y titulada "Improved SELEX and PHOTOSELEX" que se ha presentado concurrentemente con la presente solicitud. Los nucleótidos de los sitios de sustitución también se pueden utilizar para la introducción en medio del SELEX o post-SELEX de nucleótidos modificados aunque no sean fotorreactivos.

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

Los distintos métodos y etapas descritos en el presente documento se pueden utilizar para generar un aptámero capaz de modificar la bioactividad de una molécula diana por medio de la unión y/o el entrecruzamiento con la molécula diana. En una disposición se identifica un aptámero para una única molécula diana que se asocia con o es relevante para un procedimiento de enfermedad específico. Este aptámero se puede utilizar como un reactivo de diagnóstico sea *in vitro* o *in vivo*. En otra realización, un aptámero para una molécula diana que se asocia con un estado de enfermedad se puede administrar a un individuo y utilizarse para tratar la enfermedad *in vivo*. Los aptámeros y fotoaptámeros descritos en el presente documento pueden utilizarse en cualquiera de las técnicas o procedimientos o ensayos de diagnóstico, diagnóstico por imagen, selección de alto rendimiento y validación de dianas para los que se pueden utilizar aptámeros, oligonucleótidos, anticuerpos y ligandos, sin limitación. Los aptámeros y fotoaptámeros identificados en el presente documento se pueden utilizar de acuerdo con los métodos.

Los aptámeros anteriores que no tienen propiedades de tasa de disociación lenta de los aptámeros de la presente invención se han utilizado para varios fines. En casi todos dichos usos, los aptámeros con una tasa de disociación lenta tendrán una mejor actuación con respecto a los aptámeros no seleccionados por sus propiedades de tasa de disociación lenta.

El aptámero Magucen®, (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 6.168.778; Patente de EE. UU. N° 6.051.698; Patente de EE. UU. N° 6.426.335; y Patente de EE. UU. N° 6.962.784); se ha aprobado para el tratamiento de la degeneración macular, y funciona debido a su afinidad específica por el VEGF. Se han estudiado otros aptámeros y/o están en desarrollo para su uso como agentes terapéuticos. Los aptámeros no seleccionados por sus propiedades de tasa de disociación lenta también se han utilizado en muchas aplicaciones de diagnóstico y diagnóstico por imagen (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.843.653; Patente de EE. UU. N° 5.789.163; Patente de EE. UU. N° 5.858.948; Patente de EE. UU. N° 5.874.218; Patente de EE. UU. N° 6.261.783; Patente de EE. UU. N° 5.989.823; Patente de EE. UU. N° 6.177.555; Patente de EE. UU. N° 6.531.286), selección de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 6.329.145; Patente de EE. UU. N° 6.670.132; Patente de EE. UU. N° 7.258.980) y en kits PCR (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 6.186.967; Patente de EE. UU. N° 6.020.130; Patente de EE. UU. N° 5.763.173; Patente de EE. UU. N° 5.874.557; Patente de EE. UU. N° 5.693.502). Los aptámeros con una tasa de disociación lenta de esta divulgación se pueden utilizar en cualquier diagnóstico, terapia, diagnóstico por imagen o cualquier otro uso en el que se utilicen anticuerpos, aptámeros y ligandos de unión de parejas.

La divulgación proporciona aptámeros y fotoaptámeros que se identifican por los métodos mejorados desvelados en el presente documento, kits diagnósticos que incluyen dichos aptámeros y fotoaptámeros, y usos terapéuticos o diagnósticos de dichos aptámeros o fotoaptámeros. Los nuevos aptámeros y fotoaptámeros con una tasa de disociación lenta que se identifican utilizando los métodos descritos se pueden utilizar en varios ensayos que incluyen, ensayos que utilizan matrices planas, perlas, y otros tipos de soportes sólidos. Los ensayos se pueden utilizar en varios contextos que incluyen aplicaciones de investigación científica en vida, aplicaciones diagnósticas clínicas (por ejemplo, un ensayo diagnóstico para una enfermedad, o una ensayo de "bienestar" para salud preventiva); ensayos ALONA y UPS, y aplicaciones de diagnóstico por imagen *in vivo*. En algunas aplicaciones, se pueden utilizar ensayos múltiples que emplean los aptámeros y fotoaptámeros descritos.

Los aptámeros con una tasa de disociación lenta (o fotoaptámeros) descritos en el presente documento se pueden utilizar como agentes de contraste intravenoso u oral para escáneres CAT y otras aplicaciones de diagnóstico por imagen. Los escáneres CAT se utilizan en el diagnóstico de trastornos musculares u óseos, trombos sanguíneos localizados, detectar hemorragias internas, controlar enfermedades tales como el cáncer, etc. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden marcar con un componente detectable por un escáner CAT, tal como por ejemplo, yodo, bario, o gastrografín. Además, para llevar el componente detectable, el aptámero se puede diseñar para dirigir ese componente a un tejido específico o a una diana deseada. El aptámero puede servir para concentrar o localizar el componente detectable y por lo tanto mejora la relación de la señal respecto al ruido, aumentando la señal disponible. Debido a que la tasa de disociación del aptámero puede ser lo suficientemente lenta, la duración de la exploración se puede aumentar, y se puede mejorar la relación de la señal respecto al ruido en estas aplicaciones de diagnóstico por imagen.

El aptámero con una tasa de disociación lenta puede marcarse con un material diamagnético o paramagnético. En esta disposición el aptámero marcado se puede utilizar para mejorar la actuación de la imagen de resonancia magnética (MRI). La MRI es particularmente adecuada para el diagnóstico por imagen de áreas pequeñas selectivas y tejidos con alto contenido de agua o para controlar el flujo sanguíneo. La especificidad de los aptámeros con una tasa de disociación lenta puede mejorar la localización del reactivo MRI en una sección de tejido deseada. De manera similar, los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden modificar con materiales tales como el flúor, carbono 11, oxígeno 15, o nitrógeno 13, para su uso en escáneres PET. En otra disposición, los aptámeros se pueden marcar con materiales IR activos que se pueden utilizar para diagnóstico por imagen por infrarrojos. También se contempla que los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden marcar para su uso con otras modalidades de diagnóstico por imagen.

Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden utilizar como un reactivo muy sensible y específico para su incorporación en varios métodos o kits de diagnóstico *in vitro*. En algunas realizaciones, los aptámeros con una

tasa de disociación lenta se utilizan como sustitutos de anticuerpos en varios métodos de detección de enfermedades infecciosas o de otro tipo donde el aptámero para la diana de interés incluye cualquiera o ambos de un material detectable y un componente de inmovilización o captura. En estas disposiciones, el formato de ensayo puede incluir apagado de fluorescencia, métodos de hibridación, citometría de flujo, espectrometría de masas, métodos de competición o inhibición, ensayos de oligonucleótidos ligados a enzimas, SPR, métodos de onda evanescente, etc. En algunas disposiciones, el aptámero se proporciona en el kit en solución. En otras disposiciones, el aptámero en el kit se inmoviliza en un soporte sólido que se utiliza en conjunción con el ensayo para ensayar *in vivo*, etc. En varias disposiciones, el soporte sólido se diseña para la detección de una o más dianas de interés. En otras disposiciones, el kit puede además incluir reactivos para extraer la diana de interés, reactivos para la amplificación del aptámero, reactivos para llevar a cabo los lavados, reactivos de detección, etc.

Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden utilizar en estudios terapéuticos por imagen. Durante el desarrollo de los nuevos compuestos terapéuticos, a menudo es difícil evaluar ciertas características del compuesto, tales como por ejemplo, la biodistribución, la tasa de eliminación, la biodisponibilidad, las interacciones del fármaco/diana *in vivo*, etc. En muchos casos, si se utiliza un material detectable adecuado para modificar el compuesto terapéutico, se podrían utilizar estudios por imagen para evaluar todas estas características. Aunque la modificación directa de un compuesto terapéutico inhibe frecuentemente su capacidad para interactuar con su diana y por lo tanto se reduce su eficacia, el pequeño tamaño del aptámero y su especificidad a medida, lo convierte en muy adecuado para reaccionar con un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo u otro agente terapéutico basado en proteínas) mientras se minimiza cualquiera de los efectos indeseables sobre la eficacia terapéutica del compuesto. Para evaluar dichas características como la biodistribución y la tasa de eliminación, el complejo aptámero/agente terapéutico puede sobrevivir durante un largo periodo de tiempo. Estos tipos de estudios se pueden simplificar en casos en los que el compuesto terapéutico es un aptámero con una tasa de disociación lenta. En varias realizaciones, los aptámeros que se utilizan en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico por imagen, y diagnósticas pueden incluir varias modificaciones, tales como por ejemplo 2' fluoro y otras modificaciones, para aumentar la estabilidad del aptámero en la exposición a varios componentes que pueden estar presentes en una muestra de ensayo o *in vivo*, tal como, por ejemplo, nucleasas y otros componentes de la muestra o fluidos corporales.

30 Breve descripción de las figuras

La FIG. 1A ilustra un método SELEX a modo de ejemplo y la FIG. 1B ilustra un método SELEX a modo de ejemplo que incluye la etapa de incorporación de un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta o un procesamiento.

La FIG. 2 ilustra la matriz, cebador y secuencias de oligonucleótidos representativas de aptámeros que se utilizan en la divulgación. Los oligonucleótidos se prepararon por técnicas de síntesis en fase sólida. B = dT-biotina.

La FIG. 3 ilustra los histogramas de las constantes de la tasa de disociación para aptámeros de afinidad que se seleccionan sin (A) y con (B) un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta como se describe en el Ejemplo 2.

Las FIG. 4A y B muestran oligonucleótidos que se utilizaron para preparar las mezclas de candidatos o llevar a cabo varias etapas del procedimiento de selección que se describe en los Ejemplos 3 y 4. Los oligonucleótidos se prepararon por técnicas de síntesis en fase sólida. Se utilizaron dos secuencias de la mezcla de candidatos en este ejemplo, que se designaron como 1 y 2. B = dT-biotina. Los cromóforos BrdU (5-bromo-dUTP), Antraquinona (AQ), y psoraleno (Psor) se adquirieron como fosforamiditas y se añadieron al extremo 5' del cebador directo durante la síntesis. Se preparó 4-azido-2-nitro-anilina (ANA) como un derivado carbonato de para-nitro-fenilo y acoplado a una fosforamidita 5' hexilamina tras la síntesis. Se utilizaron dos secuencias de la mezcla de candidatos en este ejemplo, denominadas 1 y 2. (A) Se utilizó la matriz 1 con mezclas de candidatos que contenían 5'-BrdU, AQ, y ANA, y (B) se utilizó la matriz 2 con mezclas de candidatos que contenía 5'-Psor.

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

La FIG. 6 ilustra un análisis PAGE de actividad de entrecruzamiento de la biblioteca enriquecida TIMP-3 5' ANA/BzdU utilizando el FotoSELEX fijado en 5' descrito en el Ejemplo 3. El gel ilustra la separación del aptámero libre (A_f), el aptámero entrecruzado intramolecular (A_f^*), y el entrecruzamiento de complejos proteína:aptámero (P:A).

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

Las FIG. 8A a 8D ilustran construcciones de aptámeros que contienen varias funcionalidades diferentes y opcionales que incluyen, marcadores de inmovilización, marcadores, restos de fotoentrecruzamiento, espaciadores, y restos liberables.

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

La FIG. 10 ilustra construcciones de aptámero y cebador que se describen en la divulgación. Cy3 representa un colorante de Cianina 3, PC un enlazador fotoescindible, ANA un grupo de entrecruzamiento fotorreactivo, (AB)₂ un par de restos de biotina separados por restos dA, y (T)₈ un enlazador polidT. Las construcciones de cebador son complementarias a la región 3' fija completa de las construcciones de aptámero.

Las FIG. 11A a 11C ilustran las curvas de respuesta a la dosis para los aptámeros con una tasa de disociación

lenta frente a los aptámeros tradicionales para tres dianas diferentes.

Las FIG. 12A y 12B ilustran las curvas de actuación de un aptámero con una tasa de disociación lenta cuando la diana era un péptido.

5 La FIG. 13 ilustra un gráfico de la medición de la temperatura de fusión de varios aptámeros con una tasa de disociación lenta con respecto a la temperatura de fusión prevista.

La FIG. 14 describe las modificaciones de bases de nucleótidos incluidas en la presente divulgación. Los grupos R que se pueden utilizar se describen en adición a los enlazadores (X) que se pueden utilizar entre los puntos de unión del nucleótido y el grupo R. También se indican las posiciones para la modificación de los nucleótidos.

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

Descripción detallada

15 La práctica de la práctica de la invención desvelada en el presente documento emplea, a menos de que se indique otra cosa, métodos convencionales de química, biología, biología molecular, y técnicas de ADN recombinante al nivel de la 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 & S. Higgins, eds., Edición actual); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., Edición actual).

20 Todas las publicaciones, documentos de patente publicados, y solicitudes de patente citados en la presente especificación son indicadores del nivel de la experiencia de la técnica(s) a la que pertenece la invención. Todas las publicaciones, documentos de patentes publicadas, y solicitudes de patentes citadas en el presente documento se incorpora por tanto por referencia con la misma extensión con que se indica individualmente y específicamente para cada publicación individual, documento de patente publicada, o solicitud de patente que se incorpora por referencia.

30 Como se utiliza en la presente especificación, que incluye las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluye las referencias plurales, a menos de que el contenido dicte claramente otra cosa, y se utilizan de manera intercambiable con “al menos un” 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 similar.

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

40 Como se utiliza en el presente documento, los términos “comprende”, “comprendiendo”, “incluye”, “incluyendo”, “contiene”, “que contiene”, y cualquier variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no excluyente, tal que un procedimiento, método, producto del procedimiento o composición de materia que comprende, incluye, o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solo esos elementos sino que pueden incluir otros elementos no listados expresamente o inherentes a tal procedimiento, método, producto del procedimiento, o composición de materia.

45 Como se utiliza en el presente documento, “ligando de ácido nucleico”, “aptámero” y “clon” se utilizan de manera intercambiable para referirse a ácidos nucleicos de origen no natural que tienen o pueden tener una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero no se limita a estas, la unión de la diana, cambio catalítico de la diana, reacción con la diana de manera que se modifique o altere la diana o la actividad funcional de la diana, unión covalente a la diana (como en un inhibidor suicida), y facilitación de la reacción entre la diana y otra molécula. En una realización, la acción es la afinidad de unión específica para una molécula diana, teniendo tal molécula diana una estructura tridimensional, distinta de un polinucleótido, que se une al aptámero por medio de un mecanismo que es predominantemente independiente del emparejamiento de bases de Watson/Crick o unión en triple hélice, en el que el aptámero no es un ácido nucleico que tiene la conocida la función fisiológica conocida de unirse a la molécula diana. Los aptámeros incluyen ácidos nucleicos que se identifican de entre una mezcla de ácidos nucleicos candidatos, siendo el aptámero un ligando de una diana determinada, por el método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla de candidatos con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen afinidad aumentada para la diana con respecto a otros ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos se pueden separar del resto de la mezcla de candidatos; (b) separar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada y/o con una tasa de disociación lenta del resto de la mezcla de candidatos; y (c) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada para producir una mezcla enriquecida de ácidos nucleicos con tasa de disociación lenta, en la que se identifican los aptámeros para la molécula diana. Se reconoce que la afinidad de las interacciones es una materia con grados; sin embargo, en este contexto, la “especificidad de unión específica” de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana generalmente con un grado de afinidad mucho más alto que con el que se puede unir a otros componentes, no dianas de una mezcla o muestra. Un “aptámero” o “ligando de ácido nucleico” es un grupo de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier cantidad adecuada de nucleótidos. “Aptámeros” se refiere a más de uno de dichos grupos de moléculas. Los diferentes aptámeros pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser monocatenarios o

bicatenarios, o contener regiones bicatenarias.

Como se utiliza en el presente documento, "tasa de disociación lenta" o "tasa lenta de disociación" se refiere al tiempo que se necesita para que un complejo aptámero/diana empiece a disociarse. Esto se puede expresar en tiempo medio, $t_{1/2}$, o el punto en el que se ha disociado el 50 % del complejo aptámero/diana. La tasa de disociación o tasa de disociación de un aptámero con una tasa de disociación lenta, que se expresa con valores $t_{1/2}$, puede ser aproximadamente ≥ 30 min., ≥ 60 min., ≥ 90 min., ≥ 120 min., > 150 min., ≥ 180 min., ≥ 210 y aproximadamente ≥ 240 min.

En una disposición, 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 los que la relación de los distintos nucleótidos de la mezcla se optimiza para dar lugar a proporciones iguales de cada nucleótido en el producto final. Uno o más de los monómeros de la mezcla pueden comprender un nucleótido modificado. Se utilizan grupos de protección amidita en este procedimiento y en una realización, la concentración de monómeros es 0,1 M. Durante la síntesis se mantiene el grupo protector cinco prima en el producto de ácido nucleico. La síntesis se produce en un soporte sólido (cristal de poro controlado, CPG), y se completan al menos aproximadamente 80 ciclos para la síntesis del producto final.

Tras el procedimiento de síntesis, el producto de ácido nucleico se desprotege. Se emplea un tampón acuoso de lisina 1,0 M, pH 9,0 para escindir sitiosapurínicos mientras que se retiene el producto en el soporte (cristal de poro controlado, CPG). Estas secuencias truncadas escindidas se eliminan con agua desionizada (dl) dos veces. Se añaden 500 ul de agua dl tras los dos lavados en la preparación de la etapa de desprotección. Esta etapa implica el tratamiento con 1,0 ml de T-butilamina: metanol: agua, 1:1:2, durante 5 horas a 70 °C, seguido por congelación, filtración y evaporación hasta la desecación. El producto de ácido nucleico se purifica basándose en la hidrofobia del grupo de protección en una columna PRP-3 HPLC (Hamilton). Las fracciones de columna adecuadas se recolectan y agrupan, se desalan y se evaporan hasta desecación para eliminar los tampones de elución volátiles. El producto final se lava con agua por un procedimiento de centrifugación y luego se resuspende. Finalmente, el material resuspendido se trata para desproteger el producto final. El producto final se caracteriza por su composición de bases, extensión del cebador, y gel de secuenciación.

Una mezcla de ácidos nucleicos candidatos se puede producir también por un método enzimático utilizando 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 procedimientos sintéticos restantes son como se ha descrito anteriormente. Una vez que se prepara la biblioteca sintética, los ácidos nucleicos se pueden utilizar en una mezcla de cebador de extensión que contiene uno o más nucleótidos modificados para producir la mezcla de candidatos final en un método clásico de extensión del cebador.

Los aptámeros se pueden sintetizar por el mismo procedimiento químico que se utiliza para la síntesis de una biblioteca. Sin embargo, en vez de una mezcla de nucleótidos, se introduce un nucleótido en cada etapa de síntesis para controlar la secuencia final generada por métodos de rutina. Los nucleótidos modificados se pueden introducir en el procedimiento de síntesis en las posiciones deseadas en la secuencia. Se pueden introducir otras funcionalidades si se desea utilizando modificaciones químicas conocidas de los nucleótidos.

Como se utiliza en el presente documento, una "mezcla de candidatos" es una mezcla de ácidos nucleicos de secuencias diferentes de entre la cual se selecciona un ligando deseado. La fuente de una mezcla de candidatos puede ser a partir de ácidos nucleicos de origen natural o fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente o ácidos nucleicos producidos por una combinación de las técnicas anteriores. Se pueden incorporar nucleótidos modificados, tales como los nucleótidos con grupos fotorreactivos u otras modificaciones, a la mezcla de candidatos. Además, se puede utilizar un procedimiento SELEX para producir una mezcla de candidatos, es decir, se puede utilizar un primer experimento del procedimiento SELEX para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligandos que se utiliza como la mezcla de candidatos en un segundo experimento de procedimiento SELEX. Una mezcla de candidatos puede comprender también ácidos nucleicos con uno o más motivos estructurales comunes. Como se utiliza en el presente documento, una mezcla de candidatos también se refiere a veces a un "grupo" o una "biblioteca". Por ejemplo, un "grupo ARN" se refiere a una mezcla de candidatos compuesta por ARN.

En varias realizaciones, cada ácido nucleico de una mezcla de candidatos puede tener secuencias fijas a cada lado de una región aleatoria, para facilitar el procedimiento de amplificación. Los ácidos nucleicos de la mezcla de ácidos nucleicos candidatos pueden comprender además cada uno regiones fijas o secuencias "de cola" en sus extremos 5' y 3' para evitar la formación de parásitos de alto peso molecular durante el procedimiento de amplificación.

Como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud, y dichos nucleótidos pueden incluir desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o análogos o desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos modificados químicamente. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", y "ácido nucleico" incluyen moléculas de

cadena doble o sencilla así como moléculas de triple hélice.

Si están presentes, las modificaciones químicas de un nucleótido pueden incluir, de manera única o en cualquier posición, modificaciones en el azúcar en la posición 2', modificaciones de pirimidina de la posición 5 (por ejemplo, 5-(N-benzilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-[2-(1H-indol-3-yl)etil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetil amonio) propil] carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)] carboxiamida)-2'-desoxiuridina), modificaciones de purinas en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodouracilo, modificaciones en la estructura, metilaciones, combinaciones de pares de bases no habituales tales como las isobases isocitidina e isoguanina, y similares. Las modificaciones pueden incluir también modificaciones 3' y 5', tales como sellado o pegilación. Otras modificaciones pueden incluir la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo, modificaciones internucleótido, tales como, por ejemplo, las que tienen enlaces sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y las que tienen enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquilantes, y las que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo que están presentes habitualmente en un azúcar se pueden reemplazar por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse por grupos protectores de referencia; o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH de los extremos 3' y 5' se pueden fosforilar o sustituir con aminas, restos de un grupo de sellado orgánico de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o restos de un grupo de sellado orgánico de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 polímeros de polietilenglicol (PEG) y otros polímeros hidrófilos o hidrófobos biológicos o sintéticos. Si están presentes, se puede hacer una modificación de la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje con un polímero. Una secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido se puede modificar además después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador.

Los polinucleótidos pueden contener también formas de azúcares análogas 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 azúcar carbocíclico, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas, y lixosas, azúcares furanosa, pseudoheptulosas, análogos acíclicos y análogos abásicos de nucleósidos tales como metil ribósido. Como se ha señalado anteriormente, se pueden reemplazar uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en los que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato") P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo 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 pueden ser por ejemplo, estructuras de armazón alternativas como una estructura de poliamida.

En una realización, la región variable del aptámero incluye nucleótidos que incluyen bases modificadas. Ciertos aptámeros modificados se pueden utilizar en cualquiera de los métodos, dispositivos y kits descritos. Estos nucleótidos modificados han demostrado que producen nuevos aptámeros que tienen tasas de disociación muy lentas de sus respectivas dianas mientras que mantienen una alta afinidad por la diana. En una realización, se puede modificar la posición C-5 de las bases pirimidínicas. Los aptámeros que contienen nucleótidos con bases modificadas tienen varias propiedades que son diferentes de las propiedades de los aptámeros de referencia que incluyen solamente nucleótidos de origen natural (es decir, nucleótidos sin modificar). En una realización, el método para la modificación de los nucleótidos incluye el uso de un enlace amida. Sin embargo, se pueden utilizar otros métodos para la modificación. Se ha observado sorprendentemente que la estructura de los aptámeros identificados con una tasa de disociación lenta no parece estar de acuerdo completamente con la estructura prevista por los modelos de emparejamiento de bases de referencia. La observación se apoya en el hecho de que las temperaturas de fusión que se han medido en los aptámeros con una tasa de disociación lenta no son consistentes con las temperaturas de fusión previstas para los modelos, véase la Fig. 13. Como se muestra, parece que no hay correlación entre las temperaturas de fusión medidas y previstas de los aptámeros con una tasa de disociación lenta. Como media, la temperatura de fusión (T_m) calculada es 6 °C más baja que la T_m medida. Las temperaturas de fusión medidas indican que los aptámeros con una tasa de disociación lenta que incluyen estos nucleótidos modificados son más estables que lo que se puede prever y poseen potencialmente nuevas estructuras secundarias. Estos aptámeros modificados también tienen espectros de dicroísmo circular diferentes de los aptámeros correspondientes que incluyen solo nucleótidos sin modificar. En el caso de muchas dianas, es más probable que se identifiquen los aptámeros con una tasa de disociación lenta para una diana cuando se utilizan nucleótidos modificados en la producción de la biblioteca inicial o la mezcla de candidatos.

Las modificaciones particulares en la posición 5 de pirimidinas incluyen las que se describen en las Patentes de EE. UU. 5.719.273 y 5.945.527, así como las que se ilustran en la Fig. 14.

Como se utiliza 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 procedimiento SELEX.

“Polipéptido”, “péptido”, y “proteína” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para referirse 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 engloban 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 marcador. También se incluyen en la definición, por ejemplo, los péptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ser cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Como se utiliza en el presente documento, “nucleótido fotorreactivo” significa cualquier nucleótido modificado que es capaz de fotoentrecruzarse con una diana, tal como una proteína, al irradiarse con luz de ciertas longitudes de onda. Por ejemplo, los fotoaptámeros producidos por el procedimiento fotoSELEX puede incluir un grupo fotorreactivo que se selecciona de entre los siguientes: 5-bromouracilo (BrU), 5-yodouracilo (IU), 5-bromoviniluracilo, 5-yodoviniluracilo, 5-azidouracilo, 4-tiouracilo, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, 5-bromovinilcitosina, 5-yodovinilcitosina, 5-azidocitosina, 8-azidoadenina, 8-bromoadenina, 8-yodoadenina, 8-azidoguanina, 8-bromoguanina, 8-yodoguanina, 8-azidohipoxantina, 8-bromohipoxantina, 8-yodohipoxantina, 8-azidoxantina, 8-bromoxantina, 8-yodoxantina, 5-bromodesoxiuridina, 8-bromo-2'-desoxiadenina, 5-yodo-2'-desoxiuracilo, 5-yodo-2'-desoxicitosina, 5-[(4-azidofenacil)tio]citosina, 5-[(4-azidofenacil)tio]uracilo, 7-deaza-7-yodoadenina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-bromoadenina, y 7-deaza-7-bromoguanina. Una “pirimidina fotorreactiva” significa cualquier pirimidina modificada que es capaz de fotoentrecruzarse con una diana al irradiarse con 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 varias realizaciones, el grupo fotorreactivo funcional absorberá las longitudes de onda de luz que no se absorben por la diana o las porciones no modificadas del oligonucleótido.

“SELEX” se refiere a un procedimiento que combina la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una diana de una manera deseable (por ejemplo, uniéndose a una proteína) con la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. El ciclado iterativo opcional de las etapas de selección/amplificación permite la selección de uno o un pequeño número de ácidos nucleicos que interactúan más fuertemente con la diana de entre un grupo de un número muy grande de ácidos nucleicos. El ciclo del procedimiento de selección/amplificación continúa hasta que se alcanza un objetivo seleccionado. La metodología SELEX se describe en las Patentes SELEX. En algunas realizaciones del procedimiento SELEX, se generan aptámeros que se unen no covalentemente a sus dianas. En otras realizaciones del procedimiento SELEX, se generan aptámeros que se unen covalentemente a sus dianas.

Como se utiliza en el presente documento el término “amplificación” o “amplificando” significa cualquier procedimiento o combinación de etapas de procedimiento que aumenta la cantidad o número de copias de una molécula o clases de moléculas.

“Diana SELEX” o “molécula diana” o “diana” se refiere en el presente documento a cualquier compuesto con el que puede actuar un ácido nucleico de una manera deseada. Una molécula diana SELEX puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, polisacárido, glucoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, agente patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo en estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier parte o fragmento de cualquiera de los anteriores, etc., sin limitación. En una realización, una diana SELEX no incluye moléculas que se sabe que se unen a ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos conocidos por unirse a proteínas (por ejemplo, factores de transcripción). Virtualmente, cualquier efector químico o biológico puede ser una diana SELEX adecuada. Las moléculas de cualquier tamaño pueden servir como dianas SELEX. Una diana se puede modificar de ciertas maneras para aumentar la probabilidad o la fuerza de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana también puede incluir una variación menor de un compuesto o molécula en 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 la conjugación con un componente marcador, que no altere sustancialmente la identidad de la molécula. Una “molécula diana” o “diana” es un grupo de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. “Moléculas diana” o “dianas” se refieren a más de uno de dichos grupos de moléculas. Las realizaciones del procedimiento SELEX en el que la diana es un péptido se describen en la Patente de EE. UU. N° 6.376.190, titulada “Modified SELEX Processes Without Purified Protein”, que se incorpora en el presente documento en su totalidad. La Figura 7 enumera más de 500 dianas para las que se han producido aptámeros que incluyen varios aptámeros con una tasa de disociación lenta.

Como se utiliza en el presente documento, “molécula competidora” o “competidor” se utilizan de manera intercambiable para referirse a cualquier molécula que puede formar un complejo no específico con una molécula no diana. En este contexto, las moléculas no dianas incluyen aptámeros libres, en los que, por ejemplo, se puede utilizar un competidor para inhibir la unión del aptámero (re-unión), no específicamente, a otra molécula no diana. Una “molécula competidora” o “competidor” es un grupo de copias de un tipo o especie de molécula. “Moléculas competidoras” o “competidores” se refieren a más de uno de dichos grupos de moléculas. Las moléculas competidoras incluyen, pero no se limitan a oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN de esperma

de arenque, ADN de esperma de salmón, ARNt, sulfato de dextrano, polidextrano, polímeros de fosfodiéster abásico, dNTP, y pirofosfato). En varias realizaciones, se puede utilizar una combinación de uno o más competidores.

5 Como se utiliza en el presente documento, "complejo no específico" se refiere a una asociación no covalente entre dos o más moléculas que no son 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.

10 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta" se refiere a un procedimiento de alteración de las concentraciones relativas de ciertos componentes en una mezcla de candidatos tal que la concentración de complejos de afinidad de aptámeros que tienen tasas de disociación lentas está aumentada con respecto a la concentración de complejos de afinidad de aptámeros que tienen tasas más rápidas y menos deseables de disociación. En una realización, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta es un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta que se basa en una solución. En esta realización, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta que se basa en una solución tiene lugar en una solución, tal que ni la diana ni los ácidos nucleicos que forman los complejos de afinidad del aptámero en la mezcla están inmovilizados en un soporte sólido durante el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta. En varias realizaciones, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta puede incluir una o más etapas, que incluyen la adición de y la incubación con una molécula competidora, dilución de la muestra, o una combinación de estas (por ejemplo, dilución de la mezcla en presencia de una molécula competidora). Debido a que el efecto del procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta depende en general de las diferentes tasas de disociación de los distintos complejos de afinidad de aptámeros (es decir, los complejos de afinidad de aptámero formados entre la molécula diana y los diferentes ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos), la duración del procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se selecciona de forma que mantenga una alta proporción de complejos de afinidad de aptámero que tengan unas tasas de disociación lenta a la vez que se reduce sustancialmente el número de complejos de afinidad de aptámero que tienen tasas de disociación rápidas. El procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se puede utilizar en uno o más ciclos durante el procedimiento SELEX. Cuando la dilución y la adición de un competidor se utilizan en combinación, se pueden llevar a cabo simultánea o secuencialmente, en cualquier orden. El procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se puede utilizar cuando la concentración total de diana (proteína) en la mezcla es baja. En una realización, cuando el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta incluye la dilución, la mezcla se puede diluir tanto como sea práctico, teniendo en mente que los ácidos nucleicos retenidos en el aptámero se recuperan para rondas posteriores del procedimiento SELEX. En una realización, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta incluye el uso de un competidor así como la dilución, permitiendo que la mezcla se diluya menos de lo que puede ser necesario sin el uso de un competidor.

40 En una disposición, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta incluye la adición de un competidor, y el competidor es un polianión (por ejemplo, heparina o sulfato de dextrano (dextrano)). La heparina o el dextrano se han utilizado en la identificación de aptámeros específicos en las selecciones SELEX anteriores. En dichos métodos, sin embargo, la heparina o el dextrano están presentes *durante* la etapa de equilibrio en la que se unen la diana y el aptámero para formar complejos. En dichos métodos, según aumenta la concentración de heparina o dextrano, aumenta la relación de complejos diana/aptámero de alta afinidad con respecto a los complejos diana/aptámero de baja afinidad. Sin embargo, una alta concentración de heparina o dextrano puede reducir el número de complejos diana/aptámero de alta afinidad en equilibrio debido a la competición por la unión a la diana entre el ácido nucleico y el competidor. Por el contrario, los presentes métodos describen añadir el competidor después de que se haya permitido la formación de complejos diana/aptámero, y por lo tanto no afecta al número de complejos que se forman. La adición del competidor después de que se haya producido la unión en equilibrio entre la diana y el aptámero crea un estado de no equilibrio que evoluciona en el tiempo a un equilibrio con menos complejos diana/aptámero. La captación de complejos diana/aptámero antes de que se alcance el nuevo equilibrio enriquece la muestra en aptámeros con una tasa de disociación lenta mientras que los aptámeros con una tasa de disociación rápida se habrán disociado antes.

55 En otra realización, se utiliza un competidor polianiónico (por ejemplo, sulfato de dextrano u otro material polianiónico) en el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta para facilitar la identificación de un aptámero que es refractario a la presencia del polianión. En este contexto, "aptámero refractario polianiónico" es un aptámero que es capaz de formar un complejo aptámero/diana que es menos probable que se disocie en la solución que también contiene material refractario polianiónico que un complejo aptámero/diana que incluye un aptámero no refractario polianiónico. De esta manera, se pueden utilizar los aptámeros refractarios polianiónicos en la realización de métodos analíticos para detectar la presencia o cantidad o concentración de una diana en una muestra, en el que el método de detección incluye el uso del material polianiónico (por ejemplo, sulfato de dextrano) al que es refractario el aptámero.

65

Por lo tanto, en una disposición, se proporciona un método para producir un aptámero refractario polianiónico. En esta realización, después de poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos candidatos con la diana. Se permite que la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos lleguen al equilibrio. Se introduce un competidor polianiónico y se le deja en incubación en la solución durante un periodo de tiempo suficiente para asegurar que la mayoría de los aptámeros con una tasa de disociación rápida de la mezcla de candidatos se disocian de la molécula diana. También, se disociarán de la molécula diana los aptámeros de la mezcla de candidatos que se puedan disociar en presencia del competidor polianiónico. La mezcla se separa para aislar los aptámeros con una tasa de disociación lenta de alta afinidad que permanezcan en asociación con la molécula diana y para retirar cualquier material que no forme complejos de la solución. El aptámero se puede entonces liberar de la molécula diana y aislarse. El aptámero aislado también se puede amplificar y se aplican rondas de selección adicionales para aumentar la actuación total de los aptámeros seleccionados. Este procedimiento se puede utilizar también con un tiempo mínimo de incubación si no se necesita la selección de aptámeros con una tasa de disociación lenta para una aplicación específica.

Por lo tanto, en una disposición se proporciona un procedimiento SELEX modificado para la identificación o producción de aptámeros que tienen unas tasas de disociación lentas (largas) en el que se pone en contacto una molécula diana y una mezcla de candidatos y se incuban juntas durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la unión en equilibrio entre la molécula diana y los ácidos nucleicos que contiene la mezcla de candidatos. A continuación de la unión en equilibrio se añade a la mezcla un exceso de molécula competidora, por ejemplo, un competidor polianiónico, y se incuba la mezcla junto con el exceso de molécula competidora durante un periodo de tiempo predeterminado. Una proporción significativa de aptámeros que tienen tasas de disociación menores que este periodo de incubación predeterminado se disociarán de la diana durante el periodo de incubación predeterminado. La re-asociación de estos aptámeros con una tasa de disociación "rápida" con la diana se minimiza debido al exceso de molécula competidora que puede unirse no específicamente a la diana y ocupar los sitios de unión de la diana. Una proporción significativa de aptámeros que tienen tasas de disociación más largas permanecerán formando complejos con la diana durante el periodo de incubación predeterminado. Al final del periodo de incubación, la separación de los complejos ácido nucleico-diana del resto de la mezcla permite la separación de una población de aptámeros con una tasa de disociación lenta de los que tienen tasas de disociación rápidas. Se puede utilizar una etapa de disociación para disociar los aptámeros con una tasa de disociación lenta de sus dianas y permitir el aislamiento, identificación, secuenciación, síntesis y amplificación de aptámeros con una tasa de disociación lenta (sean aptámeros individuales o de un grupo de aptámeros con una tasa de disociación lenta) que tienen una alta afinidad y especificidad por la molécula diana. Como con el SELEX convencional las secuencias de aptámeros identificadas en una ronda del procedimiento SELEX modificado se pueden utilizar en la síntesis de una nueva mezcla de candidatos tal que las etapas de poner en contacto, unión en equilibrio, adición de una molécula competidora, incubación con la molécula competidora y separación de aptámeros con una tasa de disociación lenta se puede iterar/repetir tantas veces como se desee.

La combinación de permitir la unión en equilibrio de la mezcla de candidatos con la diana antes de la adición del competidor, seguida por la adición de un exceso de competidor y la incubación con el competidor durante un periodo de tiempo predeterminado permite la selección de una población de aptámeros que tienen tasas de disociación que son mucho mayores que las que se alcanzaban previamente.

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

El periodo de incubación predeterminado de la molécula competidora con la mezcla de la mezcla de candidatos y la molécula diana se puede seleccionar como se desee, teniendo en cuenta factores tales como la naturaleza de la diana y las tasas de disociación conocidas (si acaso) de aptámeros de la diana. Los periodos de incubación predeterminados se pueden elegir de entre: 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.

En otras disposiciones, se utiliza una dilución como procedimiento de aumento de la tasa de disociación y la incubación de la mezcla de candidatos diluida, puede dar lugar a la formación de complejos de molécula diana/aptámeros durante un periodo de tiempo determinado, que se puede elegir de entre: 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.

Disposiciones de la presente divulgación conciernen a la identificación, producción, síntesis y uso de aptámeros con una tasa de disociación lenta. Estos son aptámeros tienen una tasa de disociación ($t_{1/2}$) a partir de un complejo

aptámero-diana no covalente que es mayor que la de los aptámeros que se obtienen normalmente por el SELEX convencional. Para una mezcla que contiene complejos no covalentes de aptámero y diana, el $t_{1/2}$ representa el tiempo que necesitan la mitad de los aptámeros para disociarse de los complejos aptámero-diana. El $t_{1/2}$ de los aptámeros con una tasa de disociación lenta de acuerdo con la presente divulgación se elige de entre uno de: más o
 5 igual a aproximadamente 30 minutos; entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 240 minutos; entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos; entre aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 90 minutos, entre aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 120 minutos; entre aproximadamente 120 minutos a aproximadamente 150 minutos; entre aproximadamente 150 minutos a aproximadamente 180 minutos; entre aproximadamente 180 minutos a aproximadamente 210 minutos; entre
 10 aproximadamente 210 minutos a aproximadamente 240 minutos.

Una característica que caracteriza un aptámero que se identifica por un procedimiento SELEX es su alta afinidad por la diana. Un aptámero tendrá una constante de disociación (k_d) por su diana que se escoge de entre uno de: menos de aproximadamente 1 μ M, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de
 15 aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 100 pM, menos de aproximadamente 10 pM, menos de aproximadamente 1 pM.

“Tejido diana” o “tejido” se refiere en el presente documento a un cierto subgrupo de dianas SELEX descritas anteriormente. De acuerdo con esta definición, los tejidos son macromoléculas en un entorno heterogéneo. Como se
 20 utiliza 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 se diferencia de las dianas SELEX más simples que son normalmente moléculas solubles aisladas, tales como proteínas. En algunas realizaciones, los tejidos son macromoléculas insolubles que tienen órdenes de magnitud mayores que las dianas SELEX más simples. Los tejidos son dianas complejas compuestas de numerosas macromoléculas, cada macromolécula tiene numerosos
 25 epítomos potenciales. Las diferentes macromoléculas que comprenden los numerosos epítomos pueden ser proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., o combinaciones de los mismos. Los tejidos generalmente son una matriz física de macromoléculas que pueden ser fluidos o rígidos, ambos en términos de estructura y composición. La matriz extracelular es un ejemplo de un tejido más rígido, tanto estructuralmente como composicionalmente, mientras que una membrana bicapa es más fluida en estructura y composición. Los tejidos generalmente no son
 30 solubles y permanecen en fase sólida, y por lo tanto se puede llevar a cabo la separación con relativa facilidad. Un tejido incluye, pero no se limita a, un agregado de células habitualmente de un tipo particular junto con su sustancia intercelular que forma uno de los materiales estructurales que se utilizan comúnmente para denotar la construcción celular general de un determinado órgano, por ejemplo, el tejido renal, tejido cerebral. Las cuatro clases generales de tejidos son el tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido nervioso y tejido muscular.

Ejemplos de tejidos que se encuadran en esta definición incluyen, pero no se limitan a, agregados heterogéneos de macromoléculas tales como los trombos de fibrina que son agregados celulares de células homogéneas o heterogéneas; estructuras de mayor orden que contienen células que tienen una función específica, tales como
 40 órganos, tumores, ganglios linfáticos, arterias, etc.; y células individuales. Los tejidos y células pueden estar en su entorno 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, de membranas celulares, núcleos celulares, orgánulos celulares, etc.

Las fuentes de tejido, células o estructuras subcelulares se pueden obtener de procariotas así como de eucariotas.
 45 Estas incluyen estructuras humanas, animales, vegetales, bacterianas, fúngicas y víricas.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “agente marcador”, “marcador”, o “resto detectable”, o “elemento detectable”, o “componente detectable” se refiere a uno o más reactivos que se pueden utilizar para
 50 detectar una molécula diana que se une a un aptámero. Un resto detectable o marcador es capaz de detectarse directa o indirectamente. En general, cualquier molécula indicadora que es detectable puede ser un marcador. Los marcadores incluyen, por ejemplo, (i) moléculas indicadoras que se pueden detectar directamente gracias a que generan una señal, (ii) una pareja de miembros de una unión específica que se puede detectar indirectamente por la unión posterior con un equivalente que contiene una molécula indicadora, (iii) marcadores de masas detectables por espectrometría de masas, (iv) cebadores oligonucleótidos que pueden proporcionar una matriz para la amplificación o ligamiento, y (v) una secuencia de polinucleótido específica o secuencia de reconocimiento que puede actuar
 55 como un ligando, tal como, por ejemplo, una proteína represora, en el que los últimos dos casos el cebador oligonucleótido o la proteína represora tendrán, o serán capaces de tener, una molécula indicadora, y así. La molécula indicadora puede ser catalítica, tal como una enzima, un polinucleótido codificado por un catalítico, promotor, colorante, molécula fluorescente, cuanto puntual, molécula quimioluminiscente, coenzima, sustrato de enzima, grupo radioactivo, molécula orgánica pequeña, secuencia de polinucleótido amplificable, una partícula tal como una partícula de látex o carbono, sol metálica, cristalito, liposoma, células, etc. que pueden marcarse o no por un colorante, catalítico u otro grupo detectable, un marcador de masas que altera el peso de la molécula a la que se conjuga con fines de espectrometría de masas, y similares. Un marcador se puede seleccionar de entre materiales electromagnéticos o electroquímicos. En una realización, el marcador detectable es un colorante fluorescente. Otros marcadores y esquemas de marcado serán evidentes para un experto en la técnica basándose en la divulgación del
 65 presente documento.

Un resto (elemento o componente) detectable puede incluir cualquiera de las moléculas indicadoras enumeradas anteriormente y cualquier otro compuesto químico o componente que se pueda utilizar de cualquier manera para generar una señal detectable. El resto detectable se puede detectar por medio de una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, o cualquier otra señal detectable que depende de la identidad del resto. En el caso en el que el

5 resto detectable sea una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina), la señal se puede generar en presencia del sustrato de la enzima y cualquiera de los factores adicionales necesarios para la actividad enzimática. En el caso en el que el resto detectable sea un sustrato enzimático, la señal se puede generar en presencia de la enzima y cualquiera de los factores adicionales necesarios para la actividad enzimática. Las configuraciones de reactivos adecuadas para la unión del resto detectable a una molécula diana incluyen la unión covalente del resto detectable a

10 la molécula diana, la asociación no covalente del resto detectable con otro componente agente marcador que esté unido covalentemente a la molécula diana, y la unión covalente del resto detectable a un componente agente marcador que esté asociado no covalentemente con la molécula diana. Las tinciones proteicas universales (UPS) se describen en detalle en la Solicitud de Patente de EE. U.U. Serie N° 10/504.696, presentada el 12 de agosto de 2004, titulada "Methods and Reagents for Detecting Target Binding by Nucleic Acid Ligands".

15 "Soporte sólido" se refiere en el presente documento a cualquier sustrato que tenga una superficie a la que se puedan unir las moléculas, directamente o indirectamente, por medio de enlaces covalentes o no covalentes. Los materiales del sustrato pueden ser de origen natural, sintéticos o una modificación de un material de origen natural. Los materiales de soporte sólido pueden incluir, silicio, grafito, superficies especulares, laminados, cerámicos, plásticos (que incluyen polímeros tales como, por ejemplo, poli (vinil-cloruro), copolímeros de ciclo-olefina, poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(etileno tereftalato), politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon®), nilón, poli(vinil butirato)), germanio, arseniuro de galio, oro, plata, etc., bien que se usen por sí mismos o en conjunción con otros materiales. Se pueden considerar materiales rígidos

20 adicionales, tales como cristal, que incluye silicio y además incluye, por ejemplo, cristal que se puede adquirir como Biocristal. Otros materiales que se pueden emplear incluyen materiales porosos, tales como, por ejemplo, perlas de cristal de poro controlado. También se contempla cualquier otro material que se conozca en la técnica que sea capaz de tener incorporado en su superficie uno o más grupos funcionales, tales como cualquiera de un grupo funcional amino, carboxi, tiol, o hidroxilo, por ejemplo.

30 El soporte sólido puede tener cualquiera de varias configuraciones que varían desde simple a compleja y puede tener cualquiera de varias formas, incluyendo una tira, placa, disco, barra, partícula, incluyendo perlas, tubos, pocillos, y similares. La superficie puede ser relativamente plana (por ejemplo, un portaobjetos), esférica (por ejemplo, una perla), cilíndrica (por ejemplo, una columna), o estriada. Soportes sólidos que se pueden utilizar incluyen pocillos microtiter, portaobjetos de microscopio, membranas, perlas paramagnéticas, papel cargado,

35 películas de Langmuir-Blodgett, chips en obleas de sílice, chips de flujo continuo, y microperlas.

Como se utiliza en el presente documento, "separación" significa cualquier procedimiento por el que se separan uno o más componentes de una mezcla de otros componentes de la mezcla. Por ejemplo, los aptámeros unidos a moléculas diana se pueden separar de otros ácidos nucleicos que no están unidos a moléculas diana y de moléculas

40 no diana. Establecido más ampliamente, la separación permite la separación de todos los ácidos nucleicos de una mezcla de candidatos al menos en dos grupos basándose en su afinidad relativa y/o en la tasa de disociación para la molécula diana. La separación se puede conseguir por varios métodos conocidos en la técnica, que incluyen filtración, cromatografía de afinidad, separación líquido-líquido, HPLC, etc. Por ejemplo, los pares de ácido nucleico-proteína se pueden unir a filtros de celulosa mientras que los ácidos nucleicos no unidos no. Se pueden utilizar también columnas que retienen específicamente complejos de ácido nucleico-diana para la separación. Por ejemplo,

45 lo oligonucleótidos capaces de asociarse con una molécula diana se unen a la columna permite el uso de cromatografía de columna para separar y aislar los aptámeros de mayor afinidad. Se pueden utilizar también perlas en las que se conjugan las moléculas diana para la separación de aptámeros en una mezcla. Si las perlas son paramagnéticas, la separación se puede conseguir por medio de la aplicación de un campo magnético. Se puede utilizar la tecnología de resonancia de plasmones superficiales para separar ácidos nucleicos en una mezcla

50 inmovilizando una diana en un chip sensor y haciendo fluir la mezcla por encima del chip, en el que los ácidos nucleicos que tienen afinidad por la diana pueden unirse a la diana y el resto de los ácidos nucleicos se pueden eliminar por lavado. Se puede utilizar la separación líquido-líquido así como el retraso de filtración en gel y centrifugación en gradiente de densidad. Los marcadores de afinidad en las moléculas diana también se pueden

55 utilizar para separar moléculas de ácido nucleico unidos a la diana marcada de los aptámeros que están libres en solución. Por ejemplo, se pueden secuestrar moléculas marcadas biotiniladas, junto con los aptámeros unidos a ellas, de la solución de secuencias de ácido nucleico sin unir utilizando perlas paramagnéticas de estreptavidina biotiniladas. Los marcadores de afinidad también se pueden incorporar en el aptámero durante la preparación.

60 Como se utiliza en el presente documento, "fotoSELEX" es un acrónimo de Evolución Sistemática Fotoquímica de Ligandos por enriquecimiento Exponencial y se refiere a realizaciones del procedimiento SELEX en el que se generan aptámeros de fotocruzamiento. En una realización del procedimiento fotoSELEX, se incorpora un nucleótido fotorreactivo activado por absorción de luz en lugar de una base nativa en cualquier biblioteca ARN - o ADNss - aleatoria de oligonucleótidos, la mezcla de ácidos nucleicos moléculas diana se irradia produciendo que algunos

65 ácidos nucleicos incorporados en los complejos ácido nucleico-molécula diana se entrecrucen con la molécula diana por medio de los grupos funcionales fotorreactivos, y la etapa de selección es una selección por la actividad de

fotoentrecruzamiento. El procedimiento fotoSELEX se describe con mayor detalle en las Patentes fotoSELEX.

Como se utiliza en el presente documento, "fotoaptámero", "aptámero fotorreactivo", y "aptámero fotorreactivo" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un aptámero que contiene uno o más grupos funcionales fotorreactivos que se pueden unir covalentemente o "entrecruzarse" con una molécula diana. Por ejemplo, se puede modificar un resto de ácido nucleico de origen natural para incluir un grupo químico funcional que confiere fotorreactividad al resto de ácido nucleico al exponerse a una fuente de radiación de una onda de longitud apropiada. En algunas realizaciones, un aptámero fotorreactivo se identifica inicialmente. En otras realizaciones, se identifica primero el aptámero y posteriormente se modifica para incorporarle uno o más grupos fotorreactivos funcionales, generando de esta manera un fotoaptámero. En estas realizaciones, se pueden incorporar uno o más restos de ácido nucleico fotorreactivo en el aptámero sustituyendo en el aptámero un resto de ácido nucleico fotorreactivo en el lugar de uno o más de otros nucleótidos, tal como una o más nucleótidos timidina y/o citidina, por ejemplo, o modificando uno o más restos de ácido nucleico para incluir un grupo fotorreactivo funcional.

Los grupos fotorreactivos funcionales a modo de ejemplo que se pueden incorporar en 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-azyodoguanina, 8-bromoguanina, 8-yodoguanina, 8-azidohipoxantina, 8-bromohipoxantina, 8-yodohipoxantina, 8-azidoxantina, 8-bromoxantina, 8-yodoxantina, 5-[(4-azidophenacyl)tio]citosina, 5-[(4-azidophenacyl) tio]uracilo, 7-deaza-7-yodoadenina, 7-deaza-7-yodoguanina, 7-deaza-7-bromoadenina, y 7-deaza-7-bromoguanina.

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

Un grupo fotorreactivo funcional que se incorpora en un fotoaptámero se puede activar por cualquier método adecuado. En una realización, un fotoaptámero que contiene un grupo fotorreactivo funcional se puede entrecruzar con su diana exponiendo el fotoaptámero y su molécula diana unida a una fuente de radiación electromagnética. Tipos adecuados de radiación electromagnética incluyen luz ultravioleta, luz visible, rayos X, y rayos gamma. Las fuentes de radiación adecuadas incluyen fuentes que utilizan tanto luz monocromática como luz policromática filtrada.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "el procedimiento SELEX de afinidad" se refiere a las realizaciones del procedimiento SELEX en el que se generan aptámeros sin fotoentrecruzamiento con las dianas. En algunas realizaciones del procedimiento SELEX de afinidad, la diana se inmoviliza en un soporte sólido bien antes o después de que se ponga en contacto la diana con la mezcla de ácidos nucleicos candidatos. La asociación de la diana con el soporte sólido permite a los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos a que se unan y en el caso en el que se utilice un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta, permanecer unidos a la diana para separarse del resto de la mezcla de candidatos. La expresión "procedimiento SELEX de afinidad con perlas" se refiere a realizaciones particulares del procedimiento SELEX de afinidad en el que la diana se inmoviliza en una perla, por ejemplo, antes de ponerla en contacto con la mezcla de ácidos nucleicos candidatos. En algunas realizaciones, las perlas son perlas paramagnéticas. La expresión "procedimiento SELEX de afinidad en placas" se refiere a realizaciones en las que los complejos ácido nucleico-diana se separan de la mezcla de candidatos gracias a su asociación con un filtro, tal como un filtro de nitrocelulosa. Esto incluye realizaciones en las que la diana y los ácidos nucleicos inicialmente se ponen en contacto 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 pre-inmovilizada en el filtro. La expresión "procedimiento SELEX de afinidad en placa" se refiere a realizaciones en las que la diana está inmovilizada en la superficie de una placa, tal como, por ejemplo, una placa microtiter multipocillo. En algunas realizaciones, la placa está compuesta de poliestireno. En algunas realizaciones, la diana está unida a la placa en el procedimiento SELEX de afinidad en placa por medio de interacciones hidrófobas.

La presente divulgación describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que son capaces de unirse a moléculas diana. Más específicamente, la presente divulgación describe métodos para identificar aptámeros y/o fotoaptámeros que tienen tasas de disociación más lentas de sus respectivas moléculas diana que los aptámeros que se obtienen con los métodos SELEX previos. La divulgación describe además aptámeros y/o fotoaptámeros que se obtienen con los métodos que se describen en el presente documento y métodos de utilización de los mismos.

En una disposición, se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una tasa de disociación lenta de su molécula diana, el método comprende (a) preparar una mezcla de candidatos de secuencias de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla de candidatos con una molécula diana en la que los ácidos nucleicos con las mayores afinidades relativas para la molécula diana se unen preferentemente a la molécula diana, formando complejos ácido nucleico-molécula diana; (c) aplicar un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta para permitir la disociación de los complejos ácido nucleico-molécula diana con tasas de disociación relativamente rápidas; (d) separar los complejos ácido nucleico-molécula diana restantes de los ácidos nucleicos y

las moléculas no diana de la mezcla de candidatos; y (e) identificar un aptámero para una molécula diana. El procedimiento puede incluir además la etapa repetida de amplificación de los ácidos nucleicos que se unen a la molécula diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias que son capaces de unirse a la molécula diana y producir complejos ácido nucleico-molécula diana que tienen tasas de disociación lentas.

5 Como se ha definido anteriormente, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se puede seleccionar de entre diluir la mezcla de candidatos que contiene los complejos de ácido nucleico-diana, añadir al menos un competidor a la mezcla de candidatos que contiene los complejos ácido nucleico-molécula diana, y diluir la mezcla de candidatos que contiene los complejos de ácido nucleico-molécula diana y añadir al menos un competidor a la mezcla de candidatos que contiene los complejos ácido nucleico-molécula diana.

10 En una disposición, se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una tasa de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo el método: (a) preparar una mezcla de ácidos nucleicos candidatos; (b) poner en contacto la mezcla de candidatos con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos tienen una afinidad aumentada por la molécula diana para la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos de la mezcla de candidatos, que se unen a la molécula diana formando complejos ácido nucleico-molécula diana; (c) incubar la mezcla de candidatos y la molécula diana juntos durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir la unión en equilibrio; (d) añadir un exceso de al menos una molécula competidora a la mezcla de (c); (e) incubar la mezcla de la mezcla de candidatos, los complejos ácido nucleico-molécula diana y la molécula competidora de (d) durante un periodo de tiempo determinado; (f) separar los complejos de ácido nucleico-molécula diana de la mezcla de candidatos; (g) disociar los complejos de ácido nucleico-molécula diana para generar ácidos nucleicos libres; (h) amplificar los ácidos nucleicos libres para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos que son capaces de unirse a la molécula diana con una afinidad aumentada, pudiéndose identificar de esta manera un aptámero para una molécula diana.

25 En otra disposición, se proporciona un método para producir un aptámero que tiene una tasa de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo el método la preparación o síntesis de un aptámero que incluye una secuencia de ácido nucleico que se identifica por el siguiente procedimiento que comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla de ácidos nucleicos candidatos; (b) poner en contacto la mezcla de candidatos con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos tienen una afinidad aumentada por la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos que se unen a la molécula diana, formando complejos ácido nucleico-molécula diana; (c) incubar la mezcla de candidatos y la molécula diana juntos durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir la unión en equilibrio; (d) añadir un exceso de al menos una molécula competidora a la mezcla de (c); (e) incubar la mezcla de la mezcla de candidatos, complejos de ácido nucleico-molécula diana y la molécula competidora de (d) durante un tiempo de tiempo determinado; (f) separar los complejos de ácido nucleico-molécula diana de la mezcla de candidatos; (g) disociar los complejos de ácido nucleico-molécula diana para generar ácidos nucleicos libres; (h) amplificar los ácidos nucleicos libres para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos en secuencias de ácidos nucleicos que son capaces de unirse a la molécula diana con una afinidad aumentada, identificándose de esta manera un aptámero para la molécula diana.

40 En otra realización, se proporciona un método para identificar un aptámero que tiene una tasa de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo el método: (a) preparar una mezcla de ácidos nucleicos candidatos, en la que la mezcla de candidatos comprende ácidos nucleicos en los que una, varias o todas las pirimidinas en al menos uno, o cada, ácido nucleico de la mezcla de candidatos está modificada en la posición 5; (b) poner en contacto la mezcla de candidatos con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos tienen una afinidad aumentada por la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos que se unen a la molécula diana, formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) separar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada del resto de la mezcla de candidatos; y (d) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ácidos nucleicos que son capaces de unirse a la molécula diana con una afinidad aumentada, pudiendo identificarse un aptámero para la molécula diana.

50 En otra realización, se proporciona un método para producir un aptámero que tiene una tasa de disociación lenta de su molécula diana, comprendiendo dicho método la preparación o síntesis de un aptámero que incluye una secuencia de ácido nucleico identificada por el siguiente procedimiento: (a) preparar una mezcla de ácidos nucleicos candidatos que comprende ácidos nucleicos en los que una, varias o todas las pirimidinas de al menos uno, o cada uno, de los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos está modificada en la posición 5; (b) poner en contacto la mezcla de candidatos con una molécula diana, en la que los ácidos nucleicos tienen una afinidad aumentada para la molécula diana con respecto a otros ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos que se unen a la molécula diana, formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) separar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada del resto de la mezcla de candidatos; y (d) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a la molécula diana con afinidad aumentada, identificando de esta manera un aptámero para la molécula diana.

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

aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 120 minutos; entre aproximadamente 120 minutos a aproximadamente 150 minutos; entre aproximadamente 150 minutos a aproximadamente 180 minutos; entre aproximadamente 180 minutos a aproximadamente 210 minutos; entre aproximadamente 210 minutos a aproximadamente 240 minutos.

5 En otra disposición se proporciona un complejo no covalente de un aptámero y una diana, en el que el aptámero tiene una k_d para una diana de aproximadamente 100 nM o menos, en el que la tasa de disociación ($t_{1/2}$) del aptámero de la diana es mayor o igual a aproximadamente 30 minutos, y en el que una, varias, o todas las pirimidinas de la secuencia de ácido nucleico del aptámero están modificadas en la posición 5 de la base. Las
10 modificaciones se pueden seleccionar del grupo de compuestos que se muestran en la FIG. 14, estas modificaciones se designan como "nucleótidos de base modificada". Los aptámeros se pueden diseñar con cualquier combinación de bases pirimidínicas modificadas que se desee.

15 Los métodos mejorados para llevar a cabo el SELEX con nucleótidos modificados, que incluyen nucleótidos que contienen grupos fotoactivos o nucleótidos que contienen sitios de sustitución para grupos fotoactivos se desvelan en la Solicitud de EE. UU. Serie N° 12/175.388, titulada "Improved SELEX and PHOTOSELEX" que se ha presentado a la vez que la presente Solicitud. En otra realización la mezcla de candidatos de moléculas de ácido nucleico incluye ácidos nucleicos que contienen bases de nucleótido modificadas que pueden ayudar en la
20 formación de complejos de ácido nucleico-diana modificados con tasas de disociación relativamente lentas.

Los distintos métodos y etapas que se describen en el presente documento se pueden utilizar para generar un aptámero capaz de o (1) unirse a una molécula diana o (2) unirse a una molécula diana y posteriormente formar un enlace covalente con la molécula diana al irradiarse.

25 Los aptámeros identificados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento son útiles en varios métodos diagnósticos y terapéuticos. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se unirán a la diana durante mayor duración. Esto es útil en los métodos de diagnóstico en los que la unión de un aptámero y la diana se puede utilizar para detectar la presencia, ausencia, cantidad de o cuantificar la molécula diana y una interacción prolongada del aptámero y la diana facilita tal detección. Una ventaja similar se puede conseguir cuando se utilizan los
30 aptámeros con una tasa de disociación lenta en métodos de diagnóstico por imagen, *in vitro* o *in vivo*. Una interacción prolongada del aptámero y la diana también proporciona métodos de tratamiento terapéutico mejores en los que la interacción prolongada puede permitir un mejor efecto terapéutico, por ejemplo, debido a la activación o inhibición más larga de la molécula diana o cascada de señalización corriente abajo.

35 En consecuencia, en varias realizaciones, los aptámeros con una tasa de disociación lenta que se obtienen, identifican o producen por los métodos descritos se pueden utilizar en varios métodos de tratamiento médico o métodos de diagnóstico (*in vitro* o *in vivo*). Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden utilizar en un método para el tratamiento de una enfermedad. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden utilizar en un método para el diagnóstico de enfermedades *in vivo*. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se
40 pueden utilizar *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad. Un aptámero con una tasa de disociación lenta se puede utilizar en la fabricación de un agente terapéutico (por ejemplo, una composición farmacéutica) o la fabricación de un agente diagnóstico para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico de enfermedades. Las aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas de los aptámeros con una tasa de disociación lenta pueden estar implicadas en un resultado diagnóstico o terapéutico que depende de la unión específica y/o de alta afinidad del
45 aptámero con una tasa de disociación lenta a su diana. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta también se pueden utilizar en ensayos de validación de dianas y de selección de alto rendimiento en el procedimiento de desarrollo de fármacos.

50 Los aptámeros con una tasa de disociación lenta son reactivos adecuados para el diagnóstico molecular por imagen *in vivo*. En esta disposición se puede utilizar un aptámero con una tasa de disociación lenta *in vivo* para detectar la presencia de una patología, procedimiento 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 a su diana indica la presencia del procedimiento de enfermedad u otra afección. Por ejemplo, se puede utilizar un aptámero para el receptor del VEGF *in vivo* para detectar la presencia de cáncer en un área en particular (por ejemplo, un tejido, un órgano, etc.) del cuerpo de un
55 individuo ya que el receptor del VEGF se expresa abundantemente en tumores y su neovascularización, o se puede utilizar *in vivo* un aptámero para el receptor del EGF para detectar la presencia de cáncer en un área en particular (por ejemplo, un tejido, un órgano, etc.) del cuerpo de un individuo, ya que el receptor del EGF se expresa a menudo con altos niveles en las células tumorales. Es decir, la diana molecular estará en el dominio extracelular (ECD) de un receptor inducido, dichas dianas se localizan en el exterior de las células y son accesibles por medio del sistema
60 vascular. Además, los ECD tienden a localizarse en el sitio de la patología, incluso algunas partes pequeñas del ECD específico se pueden desprender por medio de procedimientos biológicos, que incluyen la muerte celular.

Los candidatos obvios para el diagnóstico molecular por imagen, los anticuerpos monoclonales de alta afinidad, no llegan a ser los reactivos de elección para esta aplicación. Los reactivos de diagnóstico molecular por imagen tienen
65 requisitos precisos. Tienen que tener una alta actividad de unión para la pretendida diana, y baja actividad de unión para otras dianas en un ser humano o animal. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta tienen ventajas

únicas que los hacen deseables para su uso en diagnóstico molecular por imagen *in vivo*. Por un lado, se seleccionan por tener constantes de tasa de disociación lenta, permitiendo de esta manera la residencia *in vivo* de la pretendida diana durante una cantidad de tiempo sustancial (al menos aproximadamente 30 minutos). Por otro lado, se espera que los aptámeros con una tasa de disociación lenta tengan un aclaramiento muy rápido del sistema vascular. Las constantes de tasa de disociación lenta y el rápido aclaramiento del sistema vascular son dos propiedades que se desean para el diagnóstico molecular por imagen *in vivo*. Desde la perspectiva cinética, los buenos reactivos de diagnóstico molecular por imagen *in vivo* deben localizarse en el sitio de la patología mientras que la concentración de reactivo libre en el sistema vascular circundante permanece baja. Esto es una señal respecto al ruido restringida. Las relaciones señal respecto a ruido adecuadas se pueden obtener por acumulación de la señal en el sitio de la patología en exceso respecto a la señal en el sistema vascular, o se pueden obtener por retención de una señal en el sitio de la patología mientras que disminuye la concentración en el sistema vascular.

Los aptámeros que no tienen propiedades de tasa de disociación lenta, de aproximadamente el mismo peso molecular y carga neta que los aptámeros con una tasa de disociación lenta, se han estudiado en animales y seres humanos durante más de una década. En general, se ha descubierto que estos aptámeros se aclaran del sistema vascular rápidamente, habitualmente ingresando en el riñón y/o el hígado y después se metabolizan más para la excreción. Dichos aptámeros muestran un aclaramiento denominado de "primer paso" a menos que se unan grupos accesorios de alto peso molecular (tales como por ejemplo, PEG) a los aptámeros. Se han hecho experimentos con un aptámero cuya diana era tenascina C, una proteína extracelular (no un ECD) que se encuentra en altas concentraciones en algunos tumores. En estos experimentos, el aptámero específico de la tenascina C se aclaraba rápidamente y era capaz de retenerse en el sitio del tumor debido a que la concentración local extracelular de la tenascina C era muy alta. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta, por el contrario, mantendrán la tasa de aclaramiento rápida de aptámeros pero ofrecen una ventaja cinética debido a sus tasas de disociación lentas, haciéndoles adecuados para su uso con dianas cuya presencia en el sitio de interés (por ejemplo, el sitio de la patología) pueda ser de alguna manera escaso (ECD en los tumores, por ejemplo).

Los reactivos alternativos para el diagnóstico molecular por imagen no comparten las dos propiedades de los aptámeros con una tasa de disociación lenta (es decir, tasa de disociación lenta y rápido aclaramiento del cuerpo). Los anticuerpos monoclonales a menudo tienen una alta afinidad y especificidad, y puede tener constantes de tasa de disociación lenta; sin embargo, los anticuerpos monoclonales tienen tasas de aclaramiento del sistema vascular muy lentas. Los péptidos cortos, que se identifican por medio, por ejemplo, fagos de presentación, pueden tener aclaramiento rápido pero baja afinidad y especificidad y tasas de disociación rápidas de sus pretendidas dianas. Los Aficuerpos, una versión peptídica particular de un anticuerpo mimético, pueden tener una afinidad y especificidad razonables y pueden tener un aclaramiento más rápido que los anticuerpos monoclonales, y con el fin de conseguir tasas de disociación lentas de sus dianas, los aficuerpos a menudo se producen como dímeros y multímeros de mayor orden, ralentizando su aclaramiento al mismo tiempo que se aumentan sus tasas de disociación.

Los aptámeros con una tasa de disociación lenta se pueden utilizar para el diagnóstico molecular *in vivo* con un grupo accesorio tanto para proteger el aptámero con una tasa de disociación lenta de las nucleasas en el cuerpo como para detectar la pretendida diana una vez que se une al aptámero con una tasa de disociación lenta. Por ejemplo, los aptámeros con una tasa de disociación lenta pueden ser atacados por las nucleasas en la sangre, normalmente exonucleasas (para el ADN) que se bloquean fácilmente utilizando grupos accesorios refractarios a exonucleasas en las posiciones de los extremos 5' y 3' del aptámero con una tasa de disociación lenta, o endonucleasas (para el ARN) que se bloquean fácilmente incorporando pirimidinas refractarias a las endonucleasas (tales como, por ejemplo, 2' fluoro nucleótidos) en el aptámero con una tasa de disociación lenta. La detección del complejo aptámero con una tasa de disociación lenta-diana se puede conseguir uniéndolo a un resto de detección en el aptámero con una tasa de disociación lenta. En algunas disposiciones, el resto de detección para estos fines puede incluir jaulas para moléculas radioactivas (por ejemplo, tecnecio 99), grupos de hierro para la detección por resonancia magnética, isótopos de fluoro para el diagnóstico por imagen PET, y similares. Las modificaciones que se hacen en el aptámero con una tasa de disociación lenta para proteger la integridad del aptámero con una tasa de disociación lenta en el cuerpo y posibilitar la detección de la pretendida diana se debería diseñar de forma que no interfieran en la interacción del aptámero con una tasa de disociación lenta con su diana y que no produzca que el aptámero con una tasa de disociación lenta se aclare demasiado lentamente del sistema vascular.

También se proporcionan dispositivos de diagnóstico o ensayo, por ejemplo, columnas, tiras de ensayo o biochips, que tienen adheridos uno o más aptámeros con una tasa de disociación lenta a una superficie sólida del dispositivo. El aptámero(s) se puede posicionar de forma que sea capaz de unirse a las moléculas diana que se ponen en contacto con la superficie sólida para formar complejos aptámero-diana que permanecen unidos a la superficie del dispositivo, capturando de esta manera la diana y posibilitando la detección y opcionalmente la cuantificación de la diana. Se puede proporcionar una matriz de aptámeros con una tasa de disociación lenta (que pueden ser el mismo o diferentes) en tal dispositivo.

Se proporcionan complejos que incluyen un aptámero con una tasa de disociación lenta y una molécula diana. Se proporciona una clase de aptámeros que se caracteriza por tener una alta afinidad para sus correspondientes moléculas diana y tasas de disociación lentas ($t_{1/2}$) de un complejo no covalente del aptámero y la diana.

Con referencia a la FIG. 1A, el procedimiento SELEX básico generalmente comienza con la preparación de la mezcla de ácidos nucleicos candidatos con secuencias diferentes. La mezcla de candidatos incluye en general secuencias de ácido nucleico que incluyen dos regiones fijas (es decir, cada uno de los miembros de la mezcla de candidatos contiene la mismas secuencias en la misma localización) y una región variable. Normalmente las regiones de secuencia fijas se seleccionan tal que ayuden a la etapa de amplificación descrita posteriormente, o aumenten el potencial de una determinada disposición estructural de los ácidos nucleicos en la mezcla de candidatos. La región variable proporciona normalmente la región de unión a la diana de cada ácido nucleico de la mezcla de candidatos, y esta región variable puede ser completamente aleatoria (es decir, la probabilidad de encontrar una base en cualquier posición es de una a cuatro) o solo parcialmente aleatoria (por ejemplo, la probabilidad de encontrar una base en cualquier localización se puede seleccionar a cualquier nivel entre el 0 y el 100 por cien). La mezcla de candidatos preparada se pone en contacto con la diana seleccionada bajo condiciones que favorecen que se produzca la unión entre la diana y los miembros de la mezcla de candidatos. Bajo estas condiciones, la interacción entre la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos forma generalmente parejas ácido nucleico-diana que tienen la afinidad relativa más fuerte entre los miembros de la pareja. Los ácidos nucleicos con la afinidad más alta por la diana se separan de los ácidos nucleicos con menor afinidad por la diana. El procedimiento de separación se lleva a cabo de una manera que retiene el máximo número de candidatos de alta afinidad. Estos ácidos nucleicos seleccionados durante la separación que tienen una afinidad relativamente alta por la diana se amplifican para crear una nueva mezcla de candidatos que está enriquecida en ácidos nucleicos que tienen una afinidad relativamente alta por la diana. Repitiendo las etapas de separación y amplificación anterior, la mezcla de candidatos de nueva formación contiene poco a poco secuencias únicas, y el grado medio de afinidad de la mezcla de ácidos nucleicos por la diana generalmente aumentará. Llevado a este extremo, el procedimiento SELEX producirá una mezcla de candidatos que contenga uno o un número muy bajo de ácidos nucleicos únicos que representen los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos original que tienen la afinidad más alta por la molécula diana. Sin embargo, el procedimiento básico SELEX no selecciona aptámeros que tengan tasas de disociación lenta de sus dianas.

Las Patentes SELEX y las Patentes FotoSELEX describen y elaboran este procedimiento con gran detalle. Estas patentes incluyen descripciones de las distintas dianas que se pueden utilizar en el procedimiento; métodos para la preparación de la mezcla de candidatos inicial; métodos para separar los ácidos nucleicos de una mezcla de candidatos; y métodos para amplificar los ácidos nucleicos separados para generar mezclas de candidatos enriquecidas. Las Patentes SELEX también describen soluciones de aptámeros que se obtienen para varios de los diferentes tipos de las moléculas diana, que incluyen dianas proteicas en la que la proteína es o no una proteína que se une al ácido nucleico.

Con referencia a la FIG. 1B el procedimiento SELEX modificado que se desvela en el presente documento incluye la introducción de un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta que sigue al equilibrio de la mezcla de ácidos nucleicos candidatos con la diana o dianas y una etapa de separación antes de las etapas posteriores del procedimiento SELEX. La introducción de un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta en el procedimiento SELEX básico proporciona un medio para el enriquecimiento de complejos de afinidad de aptámero con tasas de disociación lentas de un grupo de complejos ácido nucleico-diana que incluye varias tasas de disociación. Por lo tanto, el procedimiento SELEX modificado proporciona un método para identificar aptámeros que se unen a moléculas diana, y una vez que se han unido, tienen unas tasas de disociación relativamente lentas (también designadas en el presente documento como tasa de disociación) de la molécula diana.

Como se utiliza en el presente documento, "unión" se refiere en general a la formación de una asociación no covalente entre el ligando y la diana, aunque tal unión no es necesariamente reversible. Las expresiones "complejo ácido nucleico-diana" o "complejo" o "complejo de afinidad" se utilizan para referirse al producto de tal asociación de unión no covalente.

En varias realizaciones, los aptámeros con una tasa de disociación lenta pueden ser oligonucleótidos ARN o ADN de doble cadena o cadena sencilla. Los aptámeros pueden contener bases no estándar o modificadas. Además, los aptámeros pueden contener cualquier tipo de modificación. Como se utiliza en el presente documento, una "base modificada" puede incluir una modificación relativamente simple respecto a un resto de ácido nucleico natural, cuya modificación confiere un cambio en las propiedades físicas del resto de ácido nucleico. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación en la posición 5 de pirimidinas, sustitución con grupos hidrófobos, por ejemplo, bencilo, isobutilo, indol, o naftilo, o la sustitución con grupos hidrófilos, por ejemplo, amina cuaternaria o guanidinio, o grupos más "neutros", por ejemplo, imidazol y similares. Pueden estar presentes modificaciones adicionales en el anillo de ribosa, por ejemplo, en la posición 2', tales como 2'-amino (2'-NH₂) y 2'-fluoro (2'-F), o el armazón fosfodiéster, por ejemplo, fosforotioatos o metil fosfonatos.

En varias realizaciones, una mezcla de candidatos que contiene un grupo aleatorio de secuencias de ácidos nucleicos que contienen bases de nucleótidos modificadas se mezcla con una cantidad de la molécula diana y se le permite que se establezca la unión en equilibrio con la molécula diana. En general, solo algunos de los ácidos nucleicos que se unen con alta afinidad a la molécula diana se separarán eficazmente con la diana.

En varias realizaciones, la mezcla de candidatos incluye secuencias de ácidos nucleicos que tienen regiones

variables que incluyen grupos modificados. Los grupos modificados pueden ser bases de nucleótidos modificadas. La región variable puede contener secuencias completa o parcialmente aleatorias; también pueden contener subpartes de una secuencia fija que se incorpora con la región variable. Los nucleótidos de las regiones fijas también pueden contener bases de nucleótido modificadas, o pueden contener el grupo de referencia de las bases de origen natural.

En algunas realizaciones, se produce la amplificación después de que los miembros de la mezcla de ensayo se han separado, y es el ácido nucleico el que se amplifica. Por ejemplo, la amplificación de las moléculas de ARN se puede llevar a cabo por una secuencia de tres reacciones: hacer copias ADNc de los ARN seleccionados, utilizando 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. Se puede utilizar cualquier reacción o combinación de reacciones que se conocen en la técnica que sean apropiadas, incluyendo replicación de ADN, la amplificación directa de ARN y similares, como reconocerán los expertos en la técnica. El método de amplificación puede dar como resultado proporciones de la mezcla amplificadas que sean representativas de las proporciones de diferentes secuencias de la mezcla antes de la amplificación. Se sabe que muchas modificaciones en ácidos nucleicos son compatibles con la amplificación enzimática. Las modificaciones que no son compatibles con la amplificación se pueden hacer tras cada ronda de amplificación, si fuera necesario.

La mezcla de ácidos nucleicos candidatos se puede modificar de varias maneras para aumentar la probabilidad de ácidos nucleicos que tienen propiedades que faciliten u otras propiedades deseables, particularmente las que aumentan la interacción entre el ácido nucleico y la diana. Las modificaciones contempladas incluyen modificaciones que introducen otros grupos químicos que tienen la carga correcta, polaridad, enlaces hidrógeno, o interacción electrostática para aumentar las interacciones ligando-diana deseadas. Las modificaciones que pueden aumentar las propiedades de unión, que incluyen las tasas de afinidad y/o disociación, del ácido nucleico, por ejemplo, incluyen restos hidrófilos, restos hidrófobos, estructuras rígidas, grupos funcionales que se encuentran en proteínas tales como imidazoles, alcoholes primarios, carboxilatos, grupos guanidinio, grupos amino, tioles y similares. Las modificaciones se pueden utilizar también para aumentar la supervivencia de los complejos aptámero-diana bajo presiones de selección rigurosas que se pueden aplicar para producir aptámeros con una tasa de disociación lenta para una amplia variedad de dianas. En una realización se utiliza Bz-dU (benzil-dU) en la generación de las mezclas de candidatos que se utilizan para producir aptámeros con una tasa de disociación lenta, aunque otros nucleótidos modificados también son adecuados para la producción de dichos aptámeros. Otros nucleótidos modificados se muestran en la FIG. 14.

Una mezcla de candidatos con nucleótidos modificados para los fines de esta aplicación es cualquiera de las mezclas de candidatos ARN y ADN que incluyen tanto los de origen natural como nucleótidos distintos de los de origen natural. Las modificaciones adecuadas incluyen modificaciones de 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 de una base específica que esté presente (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 en particular. Se admite que la modificación no es un prerrequisito para facilitar la actividad o la capacidad de unión de los aptámeros. Los aptámeros pueden incluir restos modificados dUTP y dCTP.

Las mezclas de candidatos para los aptámeros con una tasa de disociación lenta pueden comprender un grupo de pirimidinas que tienen una modificación diferente en la posición C-5 de la base. La modificación C-5 se puede introducir por medio de un enlace amida, directamente, o indirectamente por medio de otro tipo de enlace. Estas mezclas de candidatos se utilizan en un procedimiento SELEX para identificar aptámeros con una tasa de disociación lenta. Este procedimiento puede incluir también el uso del procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta. Las mezclas de candidatos se pueden producir enzimática o sintéticamente.

Como se ha descrito anteriormente, los nucleótidos se pueden modificar en un número cualquiera de maneras, incluyendo modificaciones de la ribosa y/o fosfatos y/o posiciones de bases. Ciertas modificaciones se describen en la Patente de EE. UU. Nº 5.428.149 titulada "Method for Palladium Catalyzed Carbon-Carbon Coupling and Products", Patente de EE. UU. Nº 5.580.972 titulada "Purine Nucleoside Modifications by Palladium Catalyzed Methods", las cuales se incorporan por referencia en el presente documento. En una realización, las modificaciones son aquellas en las que otro grupo químico se une a la posición 5 de una pirimidina, la posición 8 de una purina, o la posición 2' de un azúcar. No hay limitación en el tipo del otro grupo químico que se puede incorporar en los nucleótidos individuales. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado resultante se puede amplificar o modificarse posteriormente a las etapas de amplificación (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 6.300.074 titulada "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Chemi-SELEX").

En otras realizaciones más, ciertos nucleótidos se modifican por un método para producir aptámeros que se unen y forman un entrecruzamiento covalente con su molécula diana por la foto-activación del complejo de afinidad. Este método engloba aptámeros que se unen a, fotoentrecruzan con, y/o fotoinactivan moléculas diana. En varias realizaciones, los aptámeros contienen grupos fotorreactivos que son capaces de fotoentrecruzarse con la molécula diana al irradiarse con luz. En otras realizaciones, los aptámeros son capaces de formar enlaces con la diana en ausencia de radiación.

- Un grupo fotorreactivo puede tener cualquier estructura química que contenga un fotocromóforo y que sea capaz de fotoentrecruzarse con una molécula diana. Aunque se designan en el presente documento grupos fotorreactivos, en algunos casos, como se describe posteriormente, no es necesaria la radiación para que se produzca la unión covalente entre el aptámero y la diana. En algunas realizaciones, el grupo fotorreactivo absorberá la luz de una determinada longitud de onda que no es absorbida por la diana ni por las porciones modificadas del oligonucleótido. Los grupos fotorreactivos incluyen 5-halo-uridinas, 5-halo-citosinas, 7-halo-adenosina, 2-nitro-5-aziodbenzoilos, diazirinas, aril azidas, aril azidas fluoradas, benzofenonas, amino-benzofenonas, psoralenos, antraquinonas, etc.
- Los grupos fotorreactivos en general forman enlaces con la diana por radiación de la pareja asociada de ácido nucleico-diana. En algunos casos, la radiación no se necesita para que se produzca la formación de enlaces. El entrecruzamiento que se produce normalmente será la formación de un enlace covalente entre el aptámero y la diana asociados. Sin embargo, se puede producir también una fuerte interacción iónica entre el aptámero y diana al irradiarse.
- En una realización, se produce el entrecruzamiento debido a la exposición a radiación electromagnética. La radiación electromagnética incluye la luz ultravioleta, la luz visible, los rayos X, y los rayos gamma.
- En otras varias realizaciones, una selección limitada de oligonucleótidos que utiliza el método SELEX es seguida por una selección utilizando un método fotoSELEX. Las rondas iniciales de la selección SELEX se llevan a cabo con oligonucleótidos que contienen grupos fotorreactivos. Tras un número de rondas SELEX se lleva a cabo el fotoSELEX 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 aptámero. Estos componentes o elementos adicionales son elementos o componentes estructurales que introducen una funcionalidad adicional en el aptámero y por lo tanto son elementos o componentes funcionales. El aptámero se produce además con uno o más de los siguientes componentes adicionales (también descritos como elemento o componente o medio funcional o estructural en cualquier combinación de estos términos): un marcador o componente detectable, un componente espaciador, y un marcador específico de la unión o componente o elemento de inmovilización.
- Como se ha señalado anteriormente, la presente divulgación proporciona métodos para identificar aptámeros que se unen a moléculas diana y una vez unidos tienen tasas de disociación lentas. Las tasas de disociación lentas que se obtienen con este método pueden exceder una semivida de aproximadamente una hora y como mucho aproximadamente 240 minutos, es decir, una vez que se genera el grupo de complejos ácido nucleico-diana, la mitad de los complejos del grupo permanecen unidos después de una hora. Debido al efecto de un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta que depende de las diferentes tasas de disociación de los complejos de afinidad de aptámeros, la duración del procedimiento de tasa de disociación lenta se escoge de forma que retenga una alta proporción de complejos de afinidad de aptámeros con tasas de disociación lenta mientras que se reduce el número de complejos de afinidad de aptámeros con tasas de disociación rápidas. Por ejemplo, incubando la mezcla durante periodos relativamente más largos de tiempo tras realizar el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se seleccionarán aptámeros con tasas de disociación más largas que los aptámeros seleccionados utilizando procedimientos de enriquecimiento de tasa de disociación lenta que tienen periodos de incubación más cortos.
- En varias disposiciones, la mezcla de candidatos se mezcla con una cantidad de la molécula diana y se permite que se establezca una unión en equilibrio con la molécula diana. Antes de separar la diana unida a ácidos nucleicos de los que están libres en la solución, se realiza un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta para enriquecer la población unida con tasas de disociación lenta. Como se ha señalado anteriormente, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se puede aplicar por adición de una molécula competidora, por dilución de la muestra, por una combinación de dilución de la muestra en presencia de una molécula competidora. Por lo tanto, en una realización, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se aplica introduciendo moléculas competidoras en la mezcla que contiene los complejos ácido nucleico-diana e incubando la mezcla durante cierto periodo de tiempo antes de separar los ácidos nucleicos libres de unión. La cantidad de moléculas competidoras generalmente es un orden de magnitud mayor que el de las moléculas de ácidos nucleicos y puede ser mayor en dos o más órdenes de magnitud. En otra realización, el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se aplica diluyendo la mezcla de muestra de complejos de ácido nucleico-diana varias veces (por ejemplo, al menos aproximadamente una de 2x, 3x, 4x, 5x) de volumen e incubando la mezcla un cierto periodo de tiempo antes de la separación de ácidos nucleicos libres de unión. El volumen de dilución es generalmente al menos una orden de magnitud mayor, y puede ser aproximadamente dos o más órdenes de magnitud mayor, que el volumen original. En otra realización más, una combinación de moléculas competidoras y dilución se utiliza para aplicar el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta. En otra realización, las mezclas de candidatos que han demostrado que dan como resultado un aumento de la frecuencia de aptámeros con una tasa de disociación lenta se utilizan para seleccionar varios aptámeros candidatos. Estos aptámeros se exploran para identificar los aptámeros con una tasa de disociación lenta.

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

Un elemento o resto o componente "escindible" o "liberable" se refiere a un grupo funcional en el que ciertos enlaces del grupo funcional se pueden romper para producir 2 componentes separados. En varias realizaciones, el grupo funcional se puede escindir al irradiar el grupo funcional (fotoescindible) con la longitud de onda apropiada o por tratamiento con los reactivos químicos o enzimáticos adecuados. En otra realización, el elemento liberable puede ser un enlace disulfuro que se puede tratar con un agente reductor para destruir el enlace. El elemento liberable permite al complejo de afinidad aptámero/diana que está unido a un soporte sólido que se separe del soporte sólido, tal como por elución del complejo. El elemento liberable puede ser estable en las condiciones del resto del ensayo y puede ser liberable bajo condiciones que no destruyan el complejo aptámero/diana.

Como se desvela en el presente documento, un aptámero puede comprender además un "marcador" o un "componente o elemento de inmovilización" o un "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 une a él) a un soporte sólido. Un "marcador" es un grupo 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 grupos de componente. El marcador se puede unir a o incluirse en el aptámero por cualquier método adecuado. En general, el marcador permite al aptámero asociarse, sea directa o indirectamente, con una sonda o receptor que está unido al soporte sólido. La sonda puede ser altamente específica en su interacción con el marcador y mantener esa asociación durante las etapas de procedimiento o procedimientos posteriores. Un marcador puede posibilitar la localización de un complejo de afinidad de aptámero (o complejo de afinidad de aptámero covalente opcional) en una dirección espacial definida sobre un soporte sólido. Los diferentes marcadores, por lo tanto, pueden posibilitar la localización de diferentes complejos de aptámero covalentes en diferentes direcciones definidas espacialmente sobre un soporte sólido. Un marcador puede ser un polinucleótido, un polipéptido, un ácido nucleico peptídico, un ácido nucleico bloqueado, un oligosacárido, un polisacárido, un anticuerpo, un aficuerpo, un anticuerpo mimético, un receptor celular, un ligando, un lípido, biotina, cualquier fragmento o derivado de estas estructuras, cualquier combinación de lo anterior, o cualquier otra estructura con la que se puede diseñar o configurar una sonda (o molécula enlazadora, como se describe posteriormente) para unirse o de alguna manera asociarse con especificidad. En general, un marcador se configura tal que no interactúe intramolecularmente con o si mismo o con el aptámero al que está unido o del cual es una parte. Si se utiliza SELEX para identificar un aptámero, el marcador se puede añadir al aptámero o bien pre- o post-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 se pueden incluir en ambos extremos 3' y 5' de los aptámeros en el procedimiento post-SELEX.

Como se ilustra en la FIG. 8D, un colorante fluorescente (tal como Cy3), los restos fotoescindibles y biotina se añaden todos en el extremo del aptámero. Debido a las potenciales interacciones entre el resto fotoescindible y el colorante, se inserta un espaciador entre los dos restos. Todas las construcciones se pueden sintetizar utilizando técnicas de referencia de fosforamidita. Las construcciones de aptámero representativas se muestran en la FIG. 9A a FIG. 9F. La funcionalidad puede dividirse entre el extremo 5' y 3' o combinarse en cada extremo. Además de los medios fotoescindibles, se pueden utilizar otros restos escindibles, incluyendo restos escindibles química o enzimáticamente. Se pueden utilizar varios restos espaciadores y se pueden incluir uno o más restos de biotina. También se pueden incluir marcadores (también designados como elementos o componentes de inmovilización o unión específica) distintos de la biotina. Los reactivos de construcción adecuados incluyen biotina fosforamidita, enlazador PC ((Glen Research PN 10-4920-02); PC biotina fosforamidita (Glen Research PN 10-4950-02); dSpacer CE fosforamidita (Glen Research PN 10-1914-02); Cy3 fosforamidita (Glen Research PN 10-5913-02); y Arm26-Ach Espaciador Amidita (Fidelity Systems PN SP26Ach-05).

En una realización, los modificadores de bases de los nucleótidos se utilizan en la producción de la región variable del aptámero. Estos nucleótidos modificados han demostrado que producen aptámeros que tienen tasas de disociación de sus dianas muy lentas.

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

En otra realización, los aptámeros con una tasa de disociación lenta se mezclan con o se exponen a una muestra. Se permite que el aptámero con una tasa de disociación lenta reaccione o se una a su diana específica en la muestra para formar un complejo. Se pueden utilizar varios métodos para detectar bien la diana o el aptámero. La diana se puede detectar en el complejo o al liberarse del complejo. El aptámero se puede detectar en el complejo o

5 al liberarse del complejo. El complejo aptámero/diana se puede utilizar para aislar la diana específica de otros componentes en la muestra de ensayo. Se pueden utilizar múltiples aptámeros cuando se desea un ensayo múltiple para la detección de varias dianas.
El método de la presente divulgación se ilustra en general en los Ejemplos 1-7.

10 El método de la presente divulgación se ilustra en general en los Ejemplos 1-6. El ejemplo 1 describe el método SELEX de afinidad general utilizando una mezcla de candidatos compuesta por nucleótidos modificados. El Ejemplo 2 describe un método fotoSELEX utilizando una mezcla de candidatos compuesta por nucleótidos modificados y un grupo fotorreactivo en el extremo 5', y el método SELEX mejorado en el que se utiliza la dilución para proporcionar el

15 Ejemplo 3 extiende el método descrito en el Ejemplo 2 añadiendo un competidor a la etapa de dilución. El Ejemplo 4 ilustra la eficacia del procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta. El valor medio de semivida de disociación ($t_{1/2}$) para los aptámeros que utilizan nucleótidos modificados 5-benzil-dUTP (BzdUTP), 5-isobutil-dUTP (iBdUTP), o 5-triptamino-dUTP que se seleccionan en ausencia de un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta era de 20 minutos con algunos aptámeros que tenían un valor de $t_{1/2}$ de hasta una hora. Este es

20 sustancialmente más largo que el que se ha descrito anteriormente con bases naturales u otros nucleótidos modificados. La media para aptámeros seleccionados con un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta era de más de 85 minutos. Más específicamente, con referencia a la Figura 3B, se puede apreciar que la introducción de un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta produce aptámeros con valores de $t_{1/2}$ de aproximadamente ≥ 30 min., ≥ 60 min., ≥ 90 min., ≥ 120 min., > 150 min., ≥ 180 min., ≥ 210 y

25 aproximadamente ≥ 240 min. Estas tasas de disociación para los complejos aptámero:diana no tienen precedentes.

El Ejemplo 5 describe la generación de aptámeros con una tasa de disociación lenta utilizando una mezcla de candidatos NpdUTP.

30 El Ejemplo 6 describe la generación de un aptámero con una tasa de disociación lenta para una diana peptídica.

Ejemplos

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

Ejemplo 1. Incorporación de nucleótidos modificados en bibliotecas de ácidos nucleicos que da lugar a bibliotecas enriquecidas de alta afinidad en el SELEX de afinidad

40 A. Preparación de las mezclas de candidatos

Las mezclas de candidatos se prepararon con dATP, dGTP, 5-metil-dCTP (MedCTP) y o bien dTTP o uno de tres análogos dUTP: 5-Benzil-dUTP (BzdUTP), 5-isobutil-dUTP (iBdUTP), o 5-triptamino-dUTP (TrpdUTP). Las mezclas de candidatos se prepararon por extensión de polimerasa de un cebador hibridado con una matriz biotinilada (FIG. 2). Para cada composición de mezcla de candidatos, se combinaron 4,8 nmol de cebador PCR directo y 4 nmol de matriz en 100 μ l de 1x tampón ADN polimerasa KOD (Novagen), calentado a 95 °C durante 8 minutos, y enfriado en hielo. Cada 100 μ l de la mezcla cebador:matriz se añadió a 400 μ l a la reacción de extensión que contenía 1x tampón ADN polimerasa KOD, 0,125 U/ μ l de ADN polimerasa KOD, y 0,5 mM de cada uno de dATP, MedCTP, dGTP, y dTTP o análogos de dUTP, y se incubaron a 70 °C, 30 minutos. El producto de doble cadena se capturó por

45 medio de las cadenas de biotinas de la matriz añadiendo 1 ml de perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (MagnaBind Streptavidin, Pierce, 5 mg/ml en 1 M NaCl + 0.05 % de TWEEN-20) y se incubaron a 25 °C durante 10 minutos mezclando. Las perlas se lavaron tres veces con 0,75 ml de Tampón SB1T (40 mM de HEPES, pH 7,5, 125 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 0,05 % de TWEEN-20). 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 μ l de HEPES 1 M, pH 7,5.

50 Las mezclas de candidatos se concentraron con un Centricon-30 a aproximadamente 0,2 ml, y se cuantificó por espectrometría de absorbancia UV.

B. Inmovilización de las dianas proteicas

60 Las dianas proteicas se adquirieron con marcadores poli His, tales como, marcadores (His)₆ (R&D Systems) y se inmovilizaron con perlas paramagnéticas Co⁺²-NTA (TALON, Invitrogen). Las dianas proteicas se diluyeron a 0,2 mg/ml en 0,5 ml de Tampón B/W (50 mM de fosfato-Na, pH 8,0, 300 mM de NaCl, 0,01 % de TWEEN-20), y se añadieron a 0,5 ml de perlas TALON (pre-lavadas tres veces en Tampón B/W y re-suspendidas a 10 mg/ml en Tampón B/W). La mezcla se rotó durante 30 minutos a 25 °C y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Las perlas TALON

65 revestidas con el péptido (His)₆ también se prepararon y almacenaron como anteriormente. Antes del 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

5 Las selecciones de afinidad se llevaron a cabo por separado con cada mezcla de candidatos, comparando la unión entre las perlas de diana proteica (señal, S) y las perlas (His)₆ (señal de fondo, F). Para cada muestra, se prepararon 0,5 μM de mezcla de ADN candidatos en 40 μl de SB1T. Se añadió 1 μl de complemento oligo-(His)₆ (1 mM) (FIG. 2) al ADN, junto con 10 μl de una mezcla de proteína competidora (0,1 % HSA, 10 μM de caseína, y 10 μM de protrombina en SB1T).

10 Las reacciones de unión se llevaron a cabo añadiendo 50 μl de perlas revestidas de proteína o perlas revestidas de (His)₆ (5 mg/ml en SB1T) a la mezcla de ADN e incubando a 37 °C durante 15 minutos, mezclando. La solución de ADN se retiró y se lavaron 5 veces las perlas a 37 °C con SB1T que contenía 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque (Sigma-Aldrich). A menos de que se indique, todos los lavados se llevaron a cabo re-suspendiendo las perlas en 100 μl de solución de lavado, mezclando durante 30 segundos, separando las perlas con un imán, y eliminando la solución de lavado. Los aptámeros unidos se eluyeron de las perlas añadiendo 100 μl de SB1T + 2 M de Guanidina-HCl e incubando a 37 °C, 5 minutos con mezclado. El aptámero eluido se transfirió a un nuevo tubo tras la separación magnética. Después de las dos primeras rondas de selección, los dos lavados finales de los cinco de las perlas de diana, se hicieron durante 5 minutos en vez de 30 segundos.

20 Las perlas de cebador se prepararon inmovilizando el cebador PCR inverso biotinilado en perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina (MyOne-SA, Invitrogen). Se lavaron una vez 5 ml de perlas MyOne-SA (10 mg/ml) con NaCIT (5 M NaCl, 0,01 % TWEEN-20), y se resuspendieron en 5 ml de cebador PCR inverso biotinilado (5 μM en NaCIT). La muestra se incubó a 25 °C, 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.

25 Se añadieron 25 μl de perlas de cebador (4 mg/ml en NaCIT) a los 100 μl de la solución de aptámero en Tampón de Guanidina y se incubó a 50 °C, 15 minutos con mezclado. Se retiró la solución de aptámero, y se lavaron las perlas 5 veces con SB1T. Se eluyó el aptámero de las perlas añadiendo 85 μl de NaOH 20 mM, y se incubó a 37 °C, 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 μl del eluido a un tubo nuevo tras la 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.

D. Amplificación y purificación de aptámeros

35 El aptámero ADN seleccionado se amplificó y cuantificó por QPCR. Se añadieron 48 μl de ADN a 12 μl de Mezcla QPCR (5x Tampón de ADN polimerasa KOD, 25 mM de MgCl₂, 10 μM de cebador PCR directo, 10 μM de cebador PCR inverso biotinilado, 5x SYBR verde I, 0,125 U/μl ADN Polimerasa KOD, y 1 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) y se realizó el ciclado térmico en un instrumento ABI5700 QPCR 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 hizo la cuantificación con el software del instrumento y se comparó el número de copias de ADN seleccionado con perlas de diana y perlas de (His)₆ para determinar las relaciones señal/señal de fondo.

40 Después de la amplificación, se capturó el producto PCR en perlas MyOne-SA por medio de la cadena antisentido biotinilada. Se lavaron 1,25 ml de perlas MyOne-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. Las perlas MyOne-SA (4 mg/ml en NaCl 3 M) se añadieron a 50 μl del producto QPCR de doble cadena y se incubaron a 25 °C, 5 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron una vez con SB1T, y la cadena "en sentido" se eluyó de las perlas añadiendo 200 μl de NaOH 20 mM, y se incubó a 37 °C, 1 minuto con mezclado. La cadena eluida se desechó y se lavaron las perlas 3 veces con SB1T y una vez con NaCl 16 mM.

50 La cadena de aptámero en sentido se preparó con la composición de nucleótidos apropiada por extensión del cebador a partir de la cadena antisentido inmovilizada. Las perlas se resuspendieron en 20 μl de la mezcla de reacción de extensión del cebador (1x de Tampón de ADN Polimerasa KOD, MgCl₂ 1,5 mM, 5 μM cebador PCR directo, 0,125 U/μl de ADN Polimerasa KOD, 0,5 mM de cada dATP, MedCTP, dGTP, y dTTP o análogos de dUTP) y se incubaron a 68 °C, 30 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron 3 veces con SB1T, y se eluyó la cadena de aptámero de las perlas añadiendo 85 μl de NaOH 20 mM, y se incubó a 37 °C, 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 μl del aptámero eluido a un nuevo tubo tras 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.

60 E. Rigurosidad y Retroalimentación de la Selección

La concentración relativa de diana proteica de la etapa de selección disminuyó en cada ronda en respuesta a la relación S/F de la siguiente manera, donde la señal S y la señal de fondo F se definieron en la Sección C anterior:

si

$$S/F < 10, [P]_{(i+1)} = [P]_i$$

5 si

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

10 si

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

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

- 15 La concentración de diana proteica se disminuyó ajustando la masa de las perlas de diana proteica (y perlas de (His)₆ para la determinación de la señal de fondo) que se añaden a la etapa de selección.

Después de cada ronda de selección, se determinó el estado de convergencia de la mezcla de ADN enriquecida. Se diluyeron 5 µl del producto QPCR de doble cadena hasta 200 µl con 4 mM de MgCl₂ que contenía 1x SYBR verde I.

- 20 Se superpusieron las muestras con 75 µl de aceite de silicio y se analizaron en cuanto a la convergencia utilizando un análisis C_{0t} que mide el tiempo de hibridación para las mezclas de complejos de oligonucleótidos de doble cadena. La mezcla se sometió a un ciclado térmico con el siguiente protocolo: 3 ciclos a 98 °C, 1 minuto, 85 °C, 1 minuto; 1 ciclo de 93 °C, 1 minuto, 85 °C, 15 minutos. Durante los 15 minutos a 85 °C, se midieron las imágenes de fluorescencia a intervalos de 5 segundos. La intensidad de fluorescencia se representó en función del log (tiempo)
- 25 para evaluar la diversidad de las secuencias.

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

- 30 Las constantes de unión en equilibrio de las bibliotecas enriquecidas se midieron utilizando la separación de perlas TALON. Se re-naturalizó el ADN por calentamiento a 95 °C y enfriamiento lentamente hasta 37 °C. Se formaron los complejos mezclando una concentración baja de ADN radiomarcado (~ 1x10⁻¹¹ M) con un intervalo de concentraciones de diana proteica (1x10⁻⁷ M a 1x10⁻¹² M final) en tampón SB1 (descrito anteriormente), y se incubaron a 37 °C. Una porción de cada reacción se transfirió a una membrana de nilón y se secó para determinar los recuentos totales de cada reacción. Se añadió una pequeña cantidad de 5 mg/ml de perlas MyOne TALON
- 35 (Invitrogen) al resto de cada reacción y se mezcló a 37 °C durante un minuto. Una porción se pasó a través de una placa HV MultiScreen (Millipore) al vacío para separar los complejos con proteína unida del ADN sin unir y se lavó con 100 µl de Tampón SB1. Las membranas de nilón y las Placas HV MultiScreen se sometieron a fosforoimagen y se cuantificó la radioactividad de cada muestra utilizando un FUJI FLA-3000. La fracción de ADN capturado se representó en función de la concentración de proteína y se utilizó un algoritmo de ajuste de la curva no lineal para extraer las constantes de unión en equilibrio (valores K_d) de los datos. La tabla 1 muestra los valores de K_d que se determinaron para cada mezcla de candidatos enriquecida para un grupo de dianas. NT indica que la biblioteca enriquecida para una composición de bases particular no parece que haya cambiado respecto a la mezcla de candidatos original, como se determina por el análisis C_{0t} (descrito previamente), y por lo tanto no se ensayó (NT).

- 45 La Tabla 1 muestra las constantes de unión en equilibrio (K_d) para los grupos enriquecidos de quince dianas proteicas diferentes y cuatro bibliotecas de ADN diferentes: bases de origen natural (dT), benzilo (BzdU), isobutilo (iBdU) o triptófano (TrpdU). Es deseable un aptámero con una K_d menor de 1 x 10⁻⁸. El uso de bases modificadas en el procedimiento SELEX produce un porcentaje significativamente más alto de aptámeros deseables de alta afinidad. Se observó que solo 2 de los 14 aptámeros producidos con los nucleótidos normales tienen las tasas de disociación lentas deseadas. Los aptámeros con una tasa de disociación lenta que se producen con los nucleótidos modificados se identificaron como 9 de 14, 7 de 14, y 14 de 14 para BzdUTP, iBdUTP, y TRPdUTP, respectivamente.

Tabla 1. Constantes de unión en equilibrio (K_d) de las bibliotecas enriquecidas que se seleccionan con diferentes nucleótidos modificados, presentadas en unidades de molaridad. NT = No ensayado.

Diana Proteica	dTTP	BzdUTP	iBdUTP	TrpdUTP
4-1BB	> 1,0E-07	5,6E-09	>1,0E-07	3,9E-09
B7	>1,0E-07	1,1E-08	NT	7,2E-09
B 7-2	>1,0E-07	NT	>1,0E-07	5,7E-09
CTLA-4	>1,0E-07	NT	NT	1,4E-09
Selección E	>1,0E-07	>1,0E-07	>1,0E-07	1,9E-09

Fractalquina	NT	>1,0E-07	NT	5,1E-11
Proteína GA733-1	8,9E-09	2,8E-09	4,7E-09	4,5E-10
Gp130	>10,E-07	5,9E-09	2,2E-08	1,2E-09
HMG-1	>1,0E-07	NT	2,2E-08	4,9E-09
IR	>1,0E-07	1,9E-09	1,2E-08	2,2E-10
OPG	3,7E-08	4,6E-09	9,5E-09	1,7E-10
PAI-1	>1,0E-07	3,7E-10	9,1E-10	4,3E-10
P-Caderina	>1,0E-07	3,5E-09	5,2E-09	2,7E-09
sLeptina R	>1,0E-07	2,3E-09	NT	4,6E-10

Ejemplo 2. Generación de Fotoaptámeros que utiliza FotoSELEX 5' Fijado y procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta por dilución.

5 A. Preparación de las mezclas de candidatos

Las mezclas de candidatos que contenían dATP, dCTP, dGTP, y BzdTTP se prepararon por extensión con polimerasa de un cebador hibridado con una matriz biotinilada (FIG. 4A-B). Para cada matriz, se utilizaron cuatro cebadores directos diferentes, cada uno poseía un único cromóforo en el extremo 5' (FIG. 5). Para cada mezcla de candidatos, se combinaron 11 nmol de cebador directo (con el cromóforo en 5') y 10 nmol de matriz en 250 μ l de Tampón de Extensión de Cebador (120 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM de KCl, 6 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 mM de MgSO_4 , 0,1 mg/ml de BSA, 0,1 % de Triton X-100), se calentaron a 95 $^\circ\text{C}$ durante 5 minutos, y se enfriaron en hielo. Se añadieron 125 μ l de cada mezcla cebador:matriz a 1 ml de la reacción de extensión que contenía el Tampón de extensión del Cebador, 0,125 U/ μ l de ADN Polimerasa KOD, y 0,5 de cada dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP, y se incubaron a 70 $^\circ\text{C}$, 30 minutos. Cada 1 ml de reacción se dividió en cuatro alícuotas de 250 μ l y se refrescaron en hielo. Se capturó el producto de doble cadena por medio de las cadenas con biotinas de la matriz añadiendo 1 ml de perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (MagnaBind-Streptavidin, Pierce, 5 mg/ml en 1 M de NaCl + 0,05 % de TWEEN-20) a cada alícuota de 250 μ l y se incubaron a 25 $^\circ\text{C}$ durante 60 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron tres veces con 0,5 ml de Tampón SB17T (40 mM de HEPES, pH 7,5, 125 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 5 mM de MgCl_2 , 1 mM de EDTA, 0,05 % de TWEEN-20). 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 de candidatos se concentraron con Centricon-30 a aproximadamente 0,2 ml por espectrometría de absorbancia UV.

25 B. Preparación de dianas proteicas

Las dianas proteicas sin marcar se biotinilaron por acoplamiento covalente de NHS-PEO4-biotina (Pierce) a restos de lisina. Las proteínas (300 pmol en 50 μ l) se intercambiaron en SB17T con una columna Sephadex G-25 microspin. Se añadió NHS-PEO4-biotina a 1,5 mM y se incubó la reacción a 4 $^\circ\text{C}$ durante 16 horas. El NHS-PEO4-biotina que no reaccionó se retiró con una columna Sephadex G-25 microspin.

30 C. Selección de aptámeros con el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta y fotoentrecruzamiento

Las selecciones se llevaron a cabo por separado con cada mezcla de candidatos, comparando la unión entre las muestras con diana proteica (señal S) y las muestras sin diana proteica (señal de fondo F). Las primeras tres rondas se llevaron a cabo con la selección por afinidad (sin fotoentrecruzamiento); la segunda y tercera incluye el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta. Las rondas cuatro a ocho incluyen tanto el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta como el fotoentrecruzamiento.

40 Para cada muestra, se preparó una mezcla de ADN de 90 μ l en SB17T con 10-20 pmoles de mezcla de candidatos (100 pmoles en la primera ronda) y 100 pmoles de cebador inverso. Las muestras se calentaron a 95 $^\circ\text{C}$ durante 3 minutos y se enfriaron a 37 $^\circ\text{C}$ a una tasa de 0,1 $^\circ\text{C}/\text{segundo}$. Las muestras se combinaron con 10 μ l de mezcla de proteínas competidoras (0,1 % de HSA, 10 μM de caseína y 10 μM de protrombina en SB17T), se añadieron a 0,5 mg de perlas MyOne Dynal Estreptavidina (pre-lavadas dos veces con 20 mM de NaOH y una vez con SB17T), y se incubaron a 37 $^\circ\text{C}$ durante 5 minutos con mezclado. Las perlas se retiraron por separación magnética.

Las reacciones de unión se llevaron a cabo añadiendo 10 μ l de diana proteica (0,5 μM en SB 17T) o SB 17T a 40 μ l de mezcla ADN e incubando a 37 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.

Cuando se empleaba el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta, se diluyeron las muestras 20x añadiendo 950 μ l de SB17T (precalentado a 37 °C), y se incubó a 37 °C durante 30 minutos antes de la captura de los complejos.

- 5 Se capturaron los complejos en perlas SA por medio de proteínas biotina añadiendo 0,25 mg de perlas MyOne-SA (Invitrogen) y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos con mezclado. Se retiró el ADN libre lavando las perlas cinco veces con SB17T. A menos de que se indique, todos los lavados se llevaron a cabo 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 removiendo 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, 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 μ l del aptámero eluido a un tubo nuevo tras 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.

- 15 Cuando se empleó la foto-selección, las reacciones de unión de 50 μ l, (o 1 ml de reacciones de unión tras el procedimiento de enriquecimiento de tasa 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, 500W, con espejo de 310 nm). Las muestras de candidatos 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 utilizó un filtro adicional (placa de cristal de 5 mm) para los cromóforos ANA, AQ y psoraleno para eliminar las longitudes de onda innecesarias, y potencialmente dañinas menores de 320 nm. Se capturaron los complejos como anteriormente, y se retiró el ADN no entrecruzado lavando las perlas una vez con 4 M de guanidina-HCl + 0,05 % de TWEEN-20 a 50 °C durante 10 minutos, una vez con 20 mM NaOH a 25 °C durante 2 minutos, dos veces con SB17T, y una vez con 16 mM de NaCl. El ADN entrecruzado no se eliminó de la superficie de las perlas para las etapas de amplificación.

25 D. Amplificación y purificación de aptámeros

- El aptámero ADN se amplificó y cuantificó por QPCR. Se añadieron 48 μ l de ADN a 12 μ l de mezcla QPCR (5x Tampón ADN Polimerasa KOD, 25 mM $MgCl_2$, 10 μ M cebador PCR directo, 10 μ M cebador PCR inverso biotinilado, 5x SYBR Verde I, 0,125 U/ μ l de ADN Polimerasa KOD, y 1 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) y se sometió a ciclado térmico en un instrumento QPCR MyIQ Bio-Rad con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 99,9 °C, 15 seg, 55 °C, 10 seg, 68 °C, 30 min, 30 ciclos de 99,9 °C, 15 segundos, 72 °C, 1 minuto. Para las rondas fotoSELEX, se lleva a cabo la incubación inicial de 30 minutos. La cuantificación se hizo con el software del instrumento y se comparó el número de copias de ADN seleccionado con y sin diana proteica para determinar las relaciones señal/señal de fondo.

- 35 Cuando se empleó foto-selección, se preparó una copia ADNc del ADN seleccionado por extensión del cebador 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 Cebador que contenía 5 μ M de cebador PCR inverso, 0,5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 0,125 U/ μ l ADN Polimerasa KOD) y se incubaron 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, y se incubó a 37 °C, 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 μ l del aptámero eluido a un nuevo tubo tras 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 por los 30 ciclos de 99,9 °C, 15 segundos, 72 °C, 1 minuto.

- 45 Después de la amplificación, el producto PCR se capturó en perlas MyOne-SA por medio de la cadena antisentido biotinilada. Se lavaron dos veces 1,25 ml de perlas MyOne-SA (10 mg/ml) con 0,5 ml de NaOH 20 mM, una vez con 0,5 ml de SB17T, se resuspendieron en 1,25 ml de NaCl 3 M + 0,05 % Tween, y se almacenaron a 4 °C. Se añadieron 25 μ l de perlas MyOne-SA (10 mg/ml en 3 M de NaCl) a 50 μ l de producto QPCR de doble cadena y se incubaron a 25 °C, 5 minutos con mezclado. Las perlas se lavaron una vez con SB17T, y se eluyó la cadena "en sentido" de las perlas añadiendo 200 μ l de NaOH 20 mM, y se incubó a 37 °C, 1 minuto con mezclado. La cadena eluida se desechó y las perlas se lavaron 3 veces con SB17T y una vez con NaCl 16 mM.

- 55 El aptámero de la cadena en sentido se preparó con el cromóforo apropiado por extensión del cebador a partir de la cadena antisentido inmovilizada. Las perlas se resuspendieron en 20 μ l de mezcla de reacción de extensión del cebador (1x Tampón de Extensión de Cebador, 1,5 mM de $MgCl_2$, 5 μ M de cebador directo con el cromóforo 5' adecuado, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP, y 0,125 U/ μ l de ADN Polimerasa KOD) y se incubaron a 68 °C, 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 μ l de NaOH 20 mM, y se incubaron a 37 °C, 1 minuto con mezclado. Se transfirieron 80 μ l del aptámero eluido a un nuevo tubo tras la separación magnética, se neutralizó con 20 μ l de HCl 80 mM, y se tamponó con 5 μ l de HEPES 0,1 M, pH 7,5. E. Rigurosidad y retroalimentación de la selección

La diana proteica se ajustó en cada ronda como se describe en el Ejemplo 1, Tras cada ronda de selección, el estado de convergencia del grupo enriquecido se determinó como se describe en el Ejemplo 1.

F. Constantes de unión en equilibrio de bibliotecas enriquecidas

Se determinó la afinidad de unión como se describe en el Ejemplo 1 anterior, excepto que se captura con perlas MyOne-SA. La siguiente tabla, la Tabla 2, resume las constantes de unión en equilibrio (Kd) que se obtienen utilizando el protocolo fotoSELEX con procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta.

Tabla 2. Constantes de unión en equilibrio (Kd) de las bibliotecas enriquecidas seleccionadas con diferentes cromóforos, presentadas en unidades de molaridad. Las mediciones no se hicieron en las bibliotecas que no cumplían la convergencia (indicadas con una x).

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

G. Ensayo de actividad de entrecruzamiento

La cantidad de entrecruzamiento de las bibliotecas enriquecidas se determinó midiendo el porcentaje de ADN entrecruzado con la proteína bajo condiciones de saturación de proteína y luz. El ADN radiomarcador (50 pM) se mezcló con el cebador inverso (16 nM) en SB17T, se calentó a 95 °C durante 3 minutos, y se enfrió a 37 °C a 0,1 °C/segundo. La diana proteica se añadió a la mezcla de ADN hasta una concentración final de 10 nM y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se prepararon simultáneamente las muestras de control sin proteína. Las muestras se entrecruzaron con las condiciones de cromóforo específico anteriormente, pero con una dosis de saturación (6 minutos para BrdU, 10 minutos para ANA, y 30 minutos para AQ y Psor). Se analizaron las muestras por desnaturalización PAGE, FIG. 6, y se cuantificaron y se tabularon los resultados en la Tabla 3.

Tabla 3. Cantidades de entrecruzamientos de las bibliotecas enriquecidas seleccionadas con diferentes cromóforos, presentadas en unidades de porcentaje del ADN total entrecruzado con la proteína. Las mediciones no se hicieron en bibliotecas que no cumplían la convergencia (indicadas con una x).

Diana Proteica	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 con una tasa de disociación lenta que utiliza un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta con un competidor

A. Preparación de las mezclas de candidatos

5 Se prepararon las mezclas que contenían dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP por extensión con polimerasa de un cebador hibridado con una matriz biotinilada para 94 dianas proteicas. Se combinaron 55 nmol de cebador directo (con cromóforo ANA 5') y 55 nmol de matriz en 0,5 ml de Tampón de Extensión de Cebador (120 mM de Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM de KCl, 6 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 mg/ml BSA, 0,1 % Triton X-100), se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, 48 °C durante 5 minutos, y se enfrió en hielo. La mezcla cebador:matriz se añadió a 5,5 ml de la reacción de extensión que contenía el Tampón de Extensión de Cebador, 0,125 U/ μl de ADN Polimerasa KOD, y 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP, y se incubaron a 70 °C, 60 minutos. Tras completar la reacción de extensión, la solución se refrescó en hielo. El producto de doble cadena se capturó por medio de las cadenas de biotina de la matriz añadiendo 25 ml de perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (MagnaBind-Streptavidin, Pierce, 5 mg/ml en 1 M de NaCl + 0,05 % de TWEEN-20) al producto de extensión del cebador y se incubó a 25 °C durante 15 minutos con rotación. Las perlas se lavaron tres veces con 40 ml de tampón SB 17T (40 mM de HEPES, pH 7,5, 125 mM de NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM de EDTA, 0,05 % TWEEN-20). La cadena de aptámero se eluyó de las perlas con 35,2 ml de NaOH 20 mM durante 5 minutos con agitado. La cadena eluída se neutralizó con 8,8 ml de HCl 80 mM, y se tamponó con 400 μl de HEPES 1 M, pH 7,3. Las mezclas de candidatos se concentraron con un Centricon-30 a aproximadamente 0,7 ml, y se cuantificaron por espectrometría de absorbancia UV.

B. Preparación de las dianas proteicas

25 Las dianas proteicas sin marcar se biotinilaron como se describe en el Ejemplo 2.

C. Selección de aptámeros con el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta y fotoentrecruzamiento

30 Se llevaron a cabo las selecciones por separado como se describe en el Ejemplo 2, con la adición de 10 mM de sulfato de dextrano como competidor para la re-unión del aptámero durante el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta en las rondas seis a nueve.

El procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se empleó de tres maneras distintas. En las rondas dos y tres, se diluyeron las muestras 20x añadiendo 950 μl de SB17T (precalentado a 37 °C), y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de la captura de los complejos. En las rondas cuatro y cinco, se diluyeron las muestras 20x añadiendo 950 μl de SB17T (precalentado a 37 °C), y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes del entrecruzamiento. En las rondas seis y siete, se diluyeron las muestras 20x añadiendo 950 μl de SB17T (precalentado a 37 °C). Se diluyeron de nuevo 50 μl de cada muestra diluida transfiriéndola a 950 μl de SB17T + 1' mM 5000 K de sulfato de dextrano (precalentado a 37 °C) para dar una dilución total de 400x, y se incubaron a 37 °C durante 60 minutos antes del entrecruzamiento. En las rondas ocho y nueve, se diluyeron las muestras 20x añadiendo 950 μl de SB17T (precalentado a 37 °C), y se diluyeron de nuevo y 50 μl de cada muestra transfiriéndolos a 950 μl de SB17T (precalentado a 37 °C) para dar una dilución de 400x. Finalmente se diluyeron de nuevo 50 μl de las muestras diluidas transfiriéndolas a 950 μl de SB17T + 10 mM 5000 K de sulfato de dextrano (precalentado a 37 °C) para dar una dilución total de 8000x, y se incubaron a 37 °C durante 60 minutos antes del entrecruzamiento. Se capturaron los complejos y se lavaron como se describe en el Ejemplo 2. Cuando se empleó el fotoentrecruzamiento, las reacciones de unión de 1 ml tras el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se irradiaron desde arriba con una matriz de LED de 470 nm durante 60 segundos antes de la captura del complejo como en el Ejemplo 2.

D. Amplificación y purificación de aptámeros

La amplificación y purificación se llevó a cabo como en el Ejemplo 2.

E. Rigurosidad y retroalimentación de la selección

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

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

60 La constante de la tasa de disociación del complejo aptámero:proteína (koff) se determinó para cada aptámero midiendo la fracción de complejos aptámero:proteína pre-formados que permanecían unidos tras la dilución en función del tiempo. Se equilibró el aptámero radiomarcado (50 pM) en SB17T-0,002 (SB17T con TWEEN-20

reducido al 0,002 %) a 37 °C con proteína a una concentración 10x mayor que el valor de K_d medido. Se diluyeron las muestras 100x con SB17T-0,002 a 37 °C y se retiraron alícuotas en varios puntos de tiempo y se separaron para separar los aptámeros libres de los complejos proteína:aptámero. La separación se consiguió añadiendo resina ZORBAX (Agilent) a la muestra, capturando los complejos en la resina, pasando la muestra a través de una membrana DuraPore al vacío, y lavando la resina con SB17T-0,002. Para las proteínas que no capturan eficazmente por la resina ZORBAX, se llevó a cabo el ensayo con proteína biotinilada en SB17T y la separación se conseguía capturando los complejos con perlas MyOne-SA Dyanal. Se determinó la cantidad de complejo remanente en cada punto de tiempo cuantificando el aptámero radiomarcado en la resina con un fosforoimager FUJI FLA-3000. La fracción de complejo se representó en función del tiempo y la constante de la tasa de disociación (k_{off}) y el valor de semivida de la disociación ($t_{1/2}$) se determinó ajustando los datos a una expresión analítica para las cinéticas de disociación bimolecular utilizando regresión no lineal.

G. Propiedades cinéticas de algunos aptámeros

La siguiente tabla, la Tabla 4, resume los valores de semivida de la disociación ($t_{1/2}$) que se obtuvo de los aptámeros seleccionados contra 10 dianas utilizando este protocolo.

Tabla 4. Valores de semivida de disociación ($t_{1/2}$) de aptámeros utilizando la etapa del protocolo de enriquecimiento de tasa de disociación lenta con competidor

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

Ejemplo 4: El procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta aumenta la semivida de disociación de aptámeros seleccionados

Los valores de la semivida de disociación ($t_{1/2}$) se midieron y representaron para 65 aptámeros que se seleccionaron o por el método de afinidad SELEX descrito en el Ejemplo 1 o los métodos fotoSELEX descritos en la Patente de EE. UU. N° 6.458.539, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands" sin procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta (Fig. 3A). Los valores $t_{1/2}$ también se midieron y representaron para 72 aptámeros que se habían seleccionado por el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta descrito en el Ejemplo 2 con un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta por dilución o por dilución con competidor (Fig. 3B). El valor $t_{1/2}$ medio para los aptámeros que utilizaban los nucleótidos modificados 5-benzil-dUTP (BzdUTP), 5-isobutil-dUTP (iBdUTP), o 5-triptamino-dUTP seleccionados en ausencia de un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta era de 20 minutos con algunos aptámeros que tenían un valor de $t_{1/2}$ de hasta una hora. Esto es sustancialmente más largo que el que se había descrito anteriormente con bases naturales u otros nucleótidos modificados. La media de aptámeros seleccionados con un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta era por encima de 85 minutos con algunos aptámeros que tenían un valor de $t_{1/2}$ con exceso de cuatro horas.

Ejemplo 5: Generación de aptámeros de una biblioteca aleatoria NdpUTP

A. Preparación de las mezclas de candidatos

Se prepararon las mezclas de candidatos que contenían dATP, dCTP, dGTP, y NdpUTP como se ha descrito en el Ejemplo 3 pero sin el grupo fotorreactivo 5'-ANA.

B. Inmovilización de dianas proteicas

Las dianas proteicas que contenían un marcador (His)6 y que se capturaban con perlas Co + 2-NTA como se ha descrito en el Ejemplo 1.

5

C. Selección de aptámeros con el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta

La selección de aptámeros se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3, pero sin fotoentrecruzamiento.

10

D. Amplificación y purificación de aptámeros

La amplificación y purificación se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3.

15

E. Rigurosidad y retroalimentación de la selección

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

F. Propiedades de los aptámeros

20

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

Tabla 5.

Constantes de unión de equilibrio (Kd) de aptámeros NpdUTP.	
Diana proteica	Kd (M)
bFGF	1,1e-9
Endostatina	2,0e-10
TIMP-3	1,5e-10
VEGF	7,2e-10

25

Ejemplo 6. Generación de aptámeros con una tasa de disociación lenta para una diana peptídica utilizando un procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta

A. Preparación de las mezclas de candidatos

30

Las mezclas de candidatos que contenían dATP, dCTP, dGTP, y BzdUTP se prepararon or extensión con polimerasa de un cebador con un cromóforo 5' ANA y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

B. Selección de aptámeros con procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta y fotoentrecruzamiento

35

Se llevó a cabo la selección como se ha descrito en el Ejemplo 3, con la diana peptídica biotinilada SMAP29 (Péptido Antibacteriano mieloides de oveja MAP-29, Anaspec).

C. Amplificación y purificación de aptámeros

40

La amplificación y purificación se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3.

D. Rigurosidad y retroalimentación de la selección

45

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

E. Propiedades de los aptámeros

50

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

Ejemplo 7: Captura de afinidad con perlas híbridas

55

Etapa 1: EJEMPLO 7: Mediciones de proteínas en muestras de ensayo que se capacitan por aptámeros con tasas de disociación lentas.

Etapa 1: Se mezclaron la preparación de las mezclas de aptámero/cebador y muestras de ensayo de aptámeros con un marcador de detección biotina Cy3 (4 nM de cada uno) con un 3x de exceso de sonda de captura (oligonucleótido complementario a la región 3' fija del aptámero que contenía un marcador de biotina y un elemento fotoescindible) en 1x SB17T, y se calentaron a 95 °C durante 4 minutos luego a 37 °C durante 13 minutos, y se diluyeron 1:4 en 1x SB17T. Se añadieron 55 ul de la mezcla aptámero/cebador a una placa microtiter (Hybaid nº AB-0407) y se sellaron con una lámina. Las muestras de ensayo se prepararon en una placa microtiter mezclando concentraciones conocidas de analitos proteicos en SB17T y se diluyeron en serie con SB17T.

Etapa 2: Equilibrio de la muestra

Se añadieron 55 ul de la mezcla aptámero/cebador a 55 ul de muestra de ensayo y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos en una placa microtiter sellada con lámina. La concentración de cada aptámero en la mezcla de equilibrio era de 0,5 nM. Tras el equilibrio, todas las etapas posteriores de este método se llevaron a cabo a temperatura ambiente a menos de que se señale otra cosa.

Etapa 3: Captura de aptámeros y retirada de la proteína libre

Se lavó una placa de filtración DuraPore (Millipore HV nº de cat. MAHVN4550) con 100 ul de 1x SB17T por filtración al vacío, se añadieron 133,3 ul de resina de estreptavidina-agarosa al 7,5 % (Pierce) a cada pocillo y se lavaron dos veces con 200 ul de 1x SB17T. Se transfirieron 100 ul de muestras en equilibrio a la placa Durapore que contenía la resina estreptavidina-agarosa y se incubó en un thermomixer (Eppendorf) a 800 rpm durante 5 minutos. La resina se lavó una vez con 200 ul de 1x SB17T + 100 uM de biotina con 200 ul de 1x SB17T.

Etapa 4: Marcado de la proteína con biotina

Se añadieron 100 ul de NHS-PEO4-biotina 1,2 mM, que se preparó inmediatamente antes de su uso, a la resina con el aptámero capturado y los complejos aptámero: proteína y se incubaron en un thermomixer a 800 rpm durante 20 minutos. La resina se lavó cinco veces con 200 ul de 1x SB17T por filtración al vacío.

Etapa 5: Procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta y fotoescisión

El director de goteo se retiró de la parte de abajo de la placa DuraPore y se colocó la placa sobre una placa microtiter de recolección de 1 ml. Se lavó la resina una vez con 200 ul de 1xSB17T por centrifugación a 1000 x g durante 30 segundos. Se añadieron 80 ul de 1x SB17T + 10 mM de DxSO4 a la resina y se irradiaron con la lámpara BlackRay Mercury en un thermomixer a 800 rpm durante 10 minutos. La placa DuraPore se transfirió a una nueva placa de pocillos profundos de 1 ml y se centrifugó a 1000 x g durante 30 segundos para recolectar el aptámero fotoescindido y los complejos proteína:aptámero.

Etapa 6: Captura de proteínas y retirada de aptámeros libres

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

Etapa 7: Elución del aptámero

Se añadieron 100 ul de Tampón de Elución de Fosfato Sódico (10 mM de Na₂PO₄, pH 11) a las perlas y se mezclaron durante 5 minutos. Se transfirieron 90 ul del eluido a una placa microtiter y se neutralizaron con 10 ul de Tampón de Neutralización de Fosfato Sódico (10 mM NaH₂PO₄, pH 5).

Etapa 8: Hibridación de aptámeros a las micromatrices

Se prepararon las matrices de ADN con sondas de captura de oligonucleótidos compuestas por la secuencia complementaria de la región variable de cada aptámero inmovilizado en un soporte portaobjetos de microscopio a medida. Existen múltiples matrices (submatrices) en cada portaobjetos, y las submatrices se separan físicamente fijando una junta (Grace) para la aplicación de muestras. Las matrices se pretrataron con 100 ul de Tampón de Bloqueo y se incubaron durante 15 minutos a 65 °C en un thermomixer. Se añadieron 30 ul de Tampón de Hibridación alto en sales a 90 ul del aptámero neutralizado eluido en una placa microtiter, se incubaron a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador, y se enfriaron hasta 65 °C a 0,1 °C/segundo. El Tampón de Bloqueo se retira de las matrices y se añaden 110 ul de muestra de aptámero a las matrices y se incubó en una cámara de humedad a 65 °C durante 20 horas.

Etapa 9. Lavado de las matrices

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

Etapa 10: Cantidad de Señal en las matrices

Los portaobjetos de matriz se exploraron en un TECAN LS300 recargado en un canal apropiado para la detección de Cy3 y se cuantificó la señal Cy3 de la actuación de cada matriz.
Resultados:

Los aptámeros específicos para tres diferentes dianas (bFGF, VEGF, y Mieloperoxidasa) se produjeron utilizando los métodos y materiales para el SELEX tradicional. Se hizo un segundo grupo de aptámeros específicos utilizando nucleótidos modificados en la posición 5 y se seleccionaron por la tasa de disociación lenta para sus respectivas dianas. Los aptámeros que se hicieron en el procedimiento tradicional tenían tasas de disociación medidas del orden de menos de 5 minutos. Los aptámeros hechos con los nucleótidos modificados y utilizando el procedimiento de enriquecimiento de tasa de disociación lenta durante el procedimiento de selección tenían tasas de disociación mayores de 20 minutos. Se hicieron dos grupos de aptámeros para cada diana por los dos diferentes métodos para un total de 4 poblaciones de aptámeros diferentes. La capacidad de estas poblaciones de aptámeros para medir las concentraciones de analito en el ensayo de las muestras de ensayo se evaluó como se ha descrito anteriormente en un intervalo de concentraciones de diana. La señal relativa del chip de detección de ADN se representó contra la concentración de diana introducida. Véase la FIG. 11A a 11C. La curva de respuesta de los aptámeros tradicionales es muy plana y la sensibilidad de la detección es bastante baja. La sensibilidad de la detección de las respectivas dianas con los aptámeros con una tasa de disociación lenta es excelente. Los datos apoyan la necesidad del uso de aptámeros con una tasa de disociación lenta para una actuación analítica máxima.

Ejemplo 8. Generación de aptámeros BzdU de alta afinidad para trombina humana

A. Preparación de la mezcla de candidatos

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

B. Preparación de la diana proteica

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

C. Selección de aptámeros por enriquecimiento de tasa de disociación lenta y fotoentrecruzamiento

La selección de aptámeros se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3 con la trombina humana biotilada como diana.

D. Amplificación y purificación de aptámeros

La amplificación y purificación de aptámeros se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3.

E. Rigurosidad y retroalimentación de la selección

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

F. Propiedades de los aptámeros

La constante de unión en equilibrio (Kd) del aptámero 2336-17 desde su selección era 4,4e-11 M (medida según el protocolo descrito en el Ejemplo 1) como se demuestra en la FIG. 15.

Se seleccionaron los aptámeros de cadena sencilla para la trombina humana a partir de una biblioteca que comprendía los nucleótidos naturales dA, dC, dG y dT (Block, et al., 1992). Las afinidades de unión de los aptámeros tenían valores de Kd que oscilaban entre 2,5e-8 M a 2,0e-7 M. Utilizando un protocolo similar con una biblioteca compuesta por dA, dC, dG naturales, y 5-(1-pentilil)-dUTP, los aptámeros se seleccionaron con valores valores de Kd que oscilaban entre 4e-7 M a 1e-6 M (Latham, et al., 1994). El Ejemplo 7 describe el descubrimiento de aptámeros de muy alta afinidad contra la trombina humana que se seleccionan de entre una biblioteca compuesta por dA, dC, dG, y BzdU modificado. El aptámero de mayor afinidad de esta biblioteca tenía un valor de Kd de 4,4e-11 M.

65

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"

<400> 2
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

5

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

10

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

15

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

20

<400> 3
 atatttttt ttgtcttctt gtcgttcgc 30

25

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

30

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

35

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

40

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

<400> 4

atatccgctcc tcctctccgt cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

ngggacactg ggtgcagg 78

45

<210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

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

55

<400> 5
 atatatatcc tgcaccagc gtccc 25

60

<210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

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

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

10 <400> 6
 atatttttt ttccgtctc ctctccgtc 29

<210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"
 20 <400> 7
 gtctcttgt cgtttcgc 18

<210> 8
 <211> 76
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(59)
 <223> n es a, c, g o t
 40

<400> 8
atatcccgct cgtcgctctgn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

45 **aggcagacgg tcaactc 76**

<210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"
 55 <400> 9
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

<210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

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

5 <400> 10
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

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

10

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

15

<400> 11
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

20

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

25

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

30

<400> 12
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

35

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

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

<400> 13
 atatatatga gtgaccgtct gcctg 25

45

<210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

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

55

<400> 14
 tttttttcc cgctcgctg ctg 23

60

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 647 587 T3

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

5 <400> 15
 atatttttt ttcccgctcg tcgtctg 27

10 <210> 16
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(62)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 16

atatgtgtct gtctgtgtcc tennnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnggtggagt gtggtgagg 79

30 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

40 <400> 17
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

45 <210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

50 <400> 18
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

55 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"

<400> 19

5 atatatatcc tcaccacact ccacc 25
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"

 15 <400> 20
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

 20 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"

 30 <400> 21
 atatatatcc tcaccacact ccacc 25

 35 <210> 22
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: sintética"

 45 <400> 22
 tttttttgt gtctgtctgt gtcctc 26

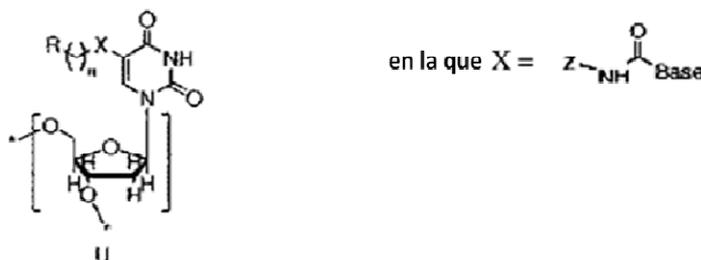
 50 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2, 4
 <223> t es dT-biotina

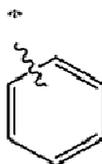
 <400> 23
 atatttttt ttgtgtctgt ctgtgtcctc 30

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une a una molécula diana, en el que todos los restos de U y/o T de la región variable del aptámero están modificados químicamente en la posición 5, teniendo los nucleótidos modificados la siguiente estructura:



en la que Z = al grupo de conexión R más $(CH_2)_n$, en la que n = 1, 2 o 3, y además en la que R es:



y en donde el aptámero tiene una tasa de disociación ($t_{1/2}$) de un complejo no covalente aptámero-molécula diana superior o igual a 30 minutos.

2. El aptámero de la reivindicación 1, en el que n = 1.
3. El aptámero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el aptámero comprende un ácido ribonucleico, un ácido ribonucleico y un ácido desoxirribonucleico, o un ácido desoxirribonucleico.
4. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho aptámero comprende una modificación del azúcar que se selecciona de entre el grupo que consiste en 2'-metilo, 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-alilo, 2'-fluoro (2'-F), 2'-amino (2'-NH₂) y 2'-azido.
5. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho aptámero comprende un resto de azúcar epimérico que se selecciona de entre el grupo que consiste en 1-arabinosilo, 1-xilosilo y 1-lixosilo y análogos α -anoméricos de los mismos.
6. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho aptámero comprende al menos una modificación adicional que comprende una modificación del armazón en el resto de fosfato que se selecciona de entre el grupo que consiste en P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), P(O)(NR₂) ("amidato"); P(O)R, P(O)OR', CO y CH₂, en donde R y R' son independientemente H, arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, aralquilo y alquilo C₁₋₂₀, conteniendo opcionalmente un enlace éter (-O-).
7. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho aptámero tiene al menos una base modificada adicional que se selecciona de entre el grupo que consiste en 5-bromo-1-uracililo, 5-yodo-1-uracililo, 5-bromovinil-1-uracililo, 5-yodovinil-1-uracililo, 5-azido-1-uracililo, 4-tio-1-uracililo, 4-tio-1-citosinilo, 5-bromo-1-citosinilo, 5-yodo-1-citosinilo, 5-bromovinil-1-citosinilo, 5-iodovinil-1-citosinilo, 5-azido-1-citosinilo, 8-azido-9-adeninilo, 8-bromo-9-adeninilo, 8-yodo-9-adeninilo, 8-azido-9-guaninilo, 8-bromo-9-guaninilo, 8-yodo-9-guaninilo, 8-azidohipoxantinilo, 8-bromohipoxantinilo, 8-iodohipoxantinilo, 8-azido-9-xantinilo, 8-bromo-9-xantinilo, 8-yodo-9-xantinilo, 5-[(4-azidofenacil)tio]-1-citosinilo, 5-[(4-azidofenacil)tio]-1-uracililo, 5-N-(bencilcarboxamido)-1-uracililo, 5-(N-isobutilcarboxamido)-1-uracililo, 5-(N-triptaminocarboxamido)-1-uracililo, 5-(N-[2-(1H-indole-3il)etil]carboxamido)-1-uracililo, 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxamido)-1-uracililo cloruro, 5-(N-naftilmetilcarboxamido)-1-uracililo, 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxamido)-1-uracililo, 7-deaza-7-yodo-9-adeninilo, 7-deaza-7-yodo-9-guaninilo, 7-deaza-7-bromo-9-adeninilo, 7-deaza-7-bromo-9-guaninilo, 1-isocitidinilo y 9-isoguaninilo.
8. Un complejo no covalente del aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y una molécula diana.
9. Un complejo no covalente de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la molécula diana es una proteína o un péptido.
10. Un complejo no covalente de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la molécula diana es una proteína

seleccionada de la Figura 7.

- 5 11. Un kit de diagnóstico que contiene el aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y reactivos para extraer la diana de interés, reactivos para amplificar el aptámero, reactivos para realizar el lavado y/o reactivos de detección.

FIG. 1A

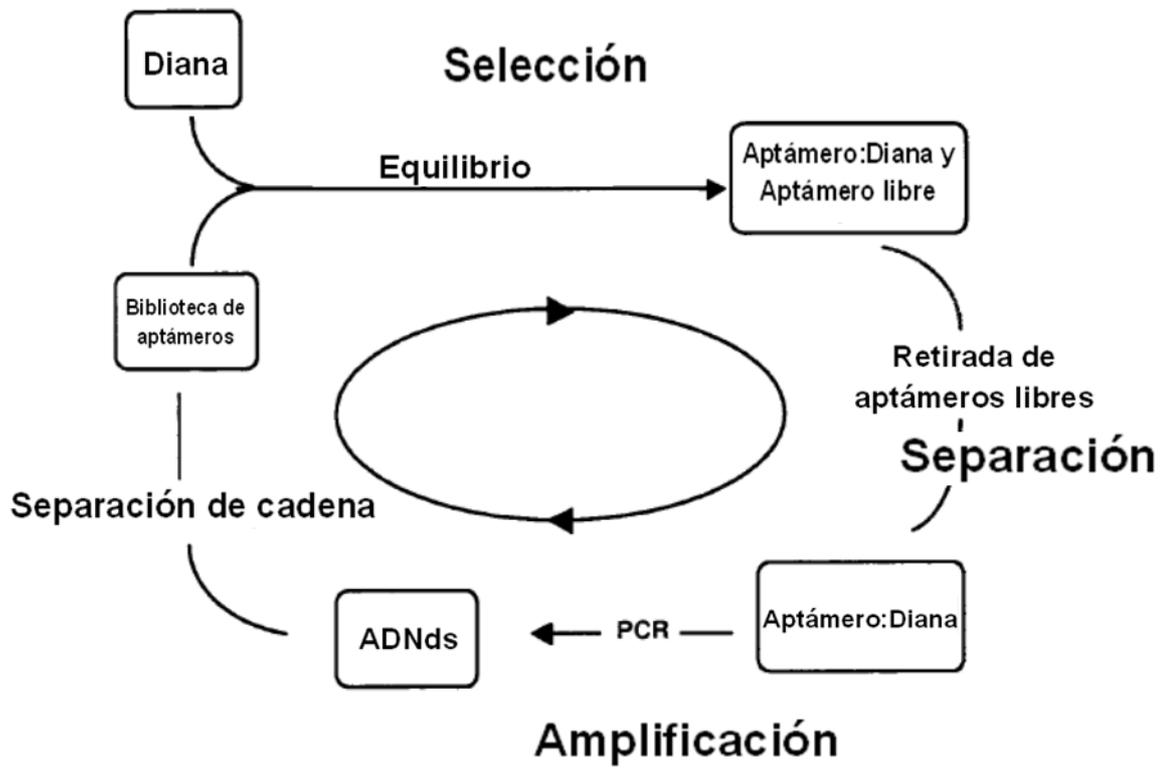
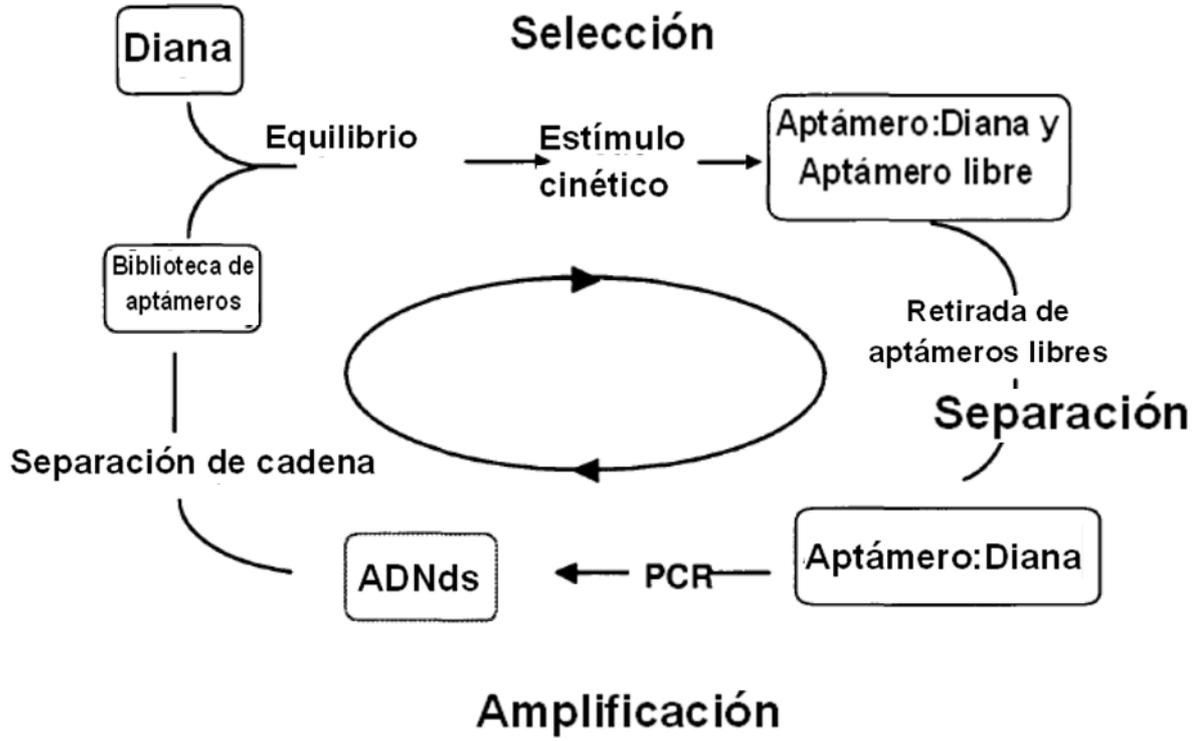


FIG. 1B



Matriz 1

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

(SEC ID Nº 1)

Cebador PCR Directo 1

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

Cebador PCR Inverso 1

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

Matriz 2

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

(SEC ID Nº 4)

Cebador PCR Directo 2

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

Cebador PCR Inverso 2

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

(His)₆ - Oligonucleótido complementario

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

FIG. 2

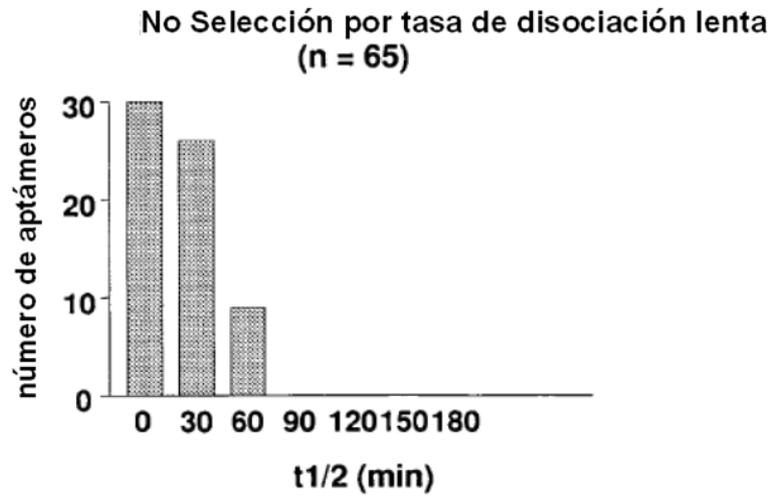


FIG. 3A

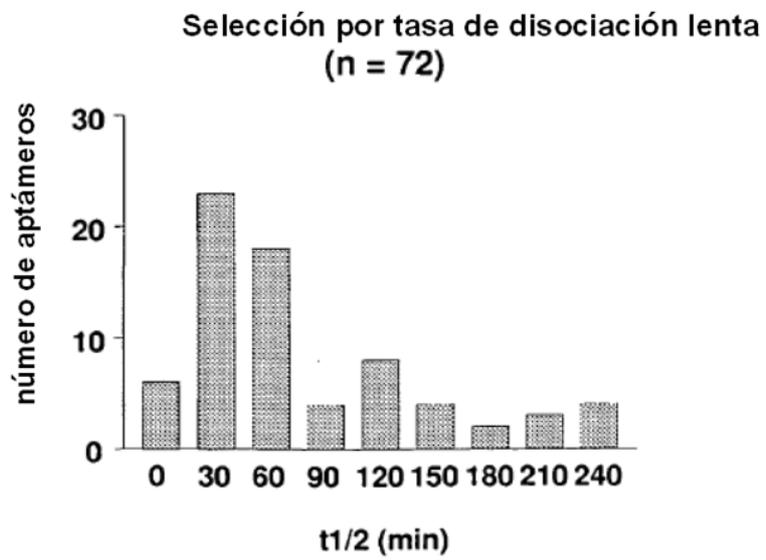


FIG. 3B

Matriz 1

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

(SEC ID Nº 8)

Cebador BrdU Directo 1

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

Directo ANA Cebador 1

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

Cebador AQ Directo 1

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

Cebador Psor Directo 1

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

Cebador PCR Directo 1

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

Cebador inverso 1

5'-TTTTTTTTTCCCGCTCGTCTG-3' (SEC ID Nº 14)

Cebador PCR Inverso 1

5'-ABABTTTTTTTTTCCCGCTCGTCTG-3' (SEC ID Nº 15)

FIG. 4A

Matriz 2

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

(SEC ID N° 16)

Cebador BrdU Directo 2

5'- BrdU - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID N° 17)

Cebador ANA Directo 2

5'- ANA - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID N° 18)

Cebador AQ Directo 2

5'- AQ - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID N° 19)

Cebador Psor Directo 2

5'- Psor - ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID N° 20)

Cebador PCR Directo 2

5'-ATATATATCCTCACCACACTCCACC-3' (SEC ID N° 21)

Cebador inverso 2

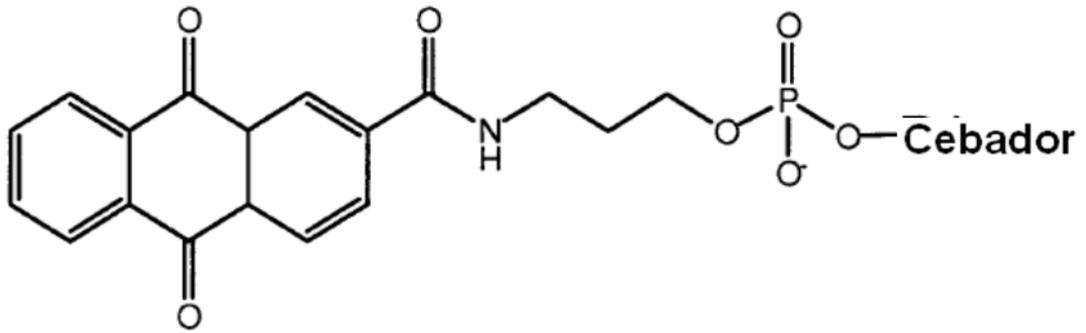
5'-TTTTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEC ID N° 22)

Cebador PCR Inverso 2

5'- ABABTTTTTTTTGTGTCTGTCTGTGTCCTC-3' (SEC ID N° 23)

FIG. 4B

Antraquinona (AQ)



Psoraleno (Psor)

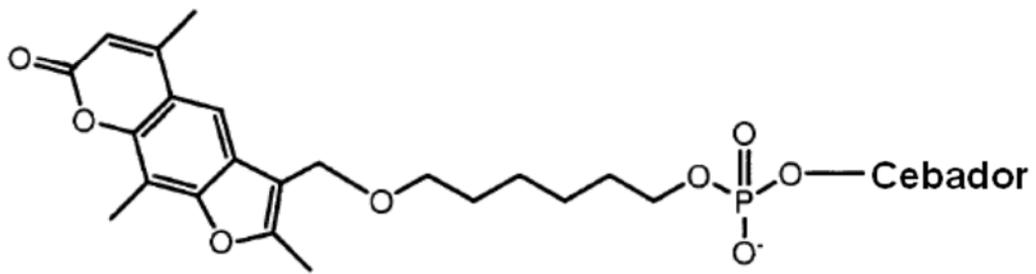
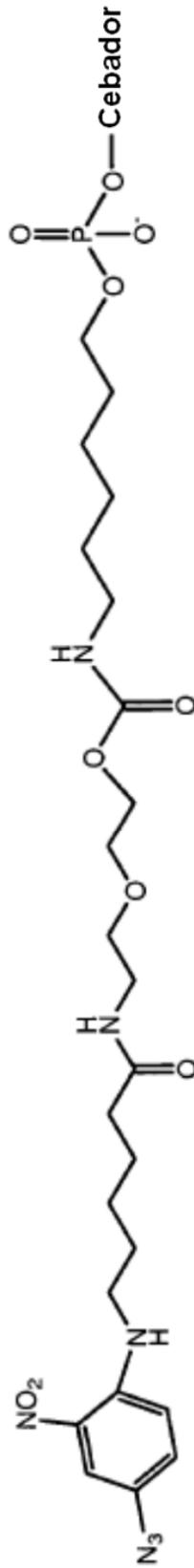


FIG. 5

FIG. 5 Cont.

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



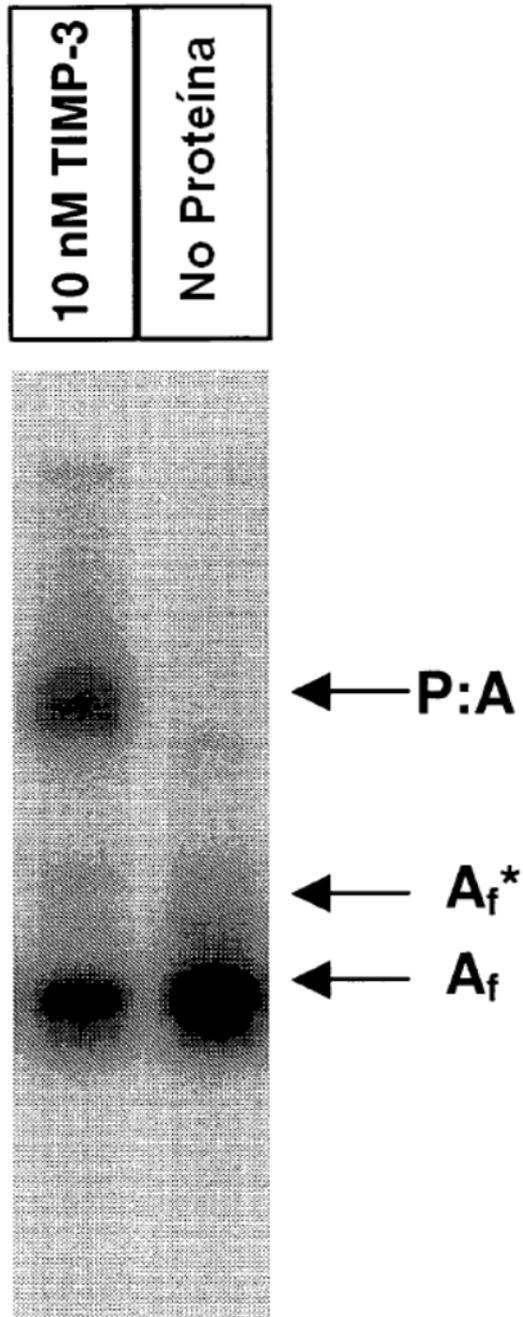


FIG. 6

FIG. 7

4-1BB	C4	Citocromo P450 3A4	GAS1
Ligando 4-1BB	C4b	DAN	GASP-2
6Cquina	C5	DARPP-32	G-CSF-R
a1-Antiquimotripsina	C5a	DC-SIGN	GDF-9
a2-Antiplasmina	C5b, Complejo 6	DC-SIGN R	GDF-11
ACE2	C6	Dímero-D	GDNF
Proteína Activada C	C7	Proteína DEAD-box 19B	GFAP
Activina A	C8	Desmogleína-1	GFRa-1
Activina RIA	C9	DKK1	GFRa-2
Activina RIB	Caderina E	DLL4	GFRa-3
ADAMTS-4	Caderina-5	Dopa decarboxilasa	GIB
ADAMTS-5	Calcineurina B a	DRG-1	GIIE
Agregcán	Calpaína I	DRR1	GITR
AIF1	Calpastatina	Dtk	Receptor de Glucocorticoide
ALCAM	Anhidrasa Carbónica IV	EDA (A2)	Glutamato Carboxipeptidasa
ALK-1	Cardiotrofina-1	EDAR	Glutatión S-transferasa Pi
Fosfatasa alcalina, hueso	Caspasa-3 (pro)	EG-VEGF	Glupicán 3
AMPM2	Catalasa	eIF-5	gp130, soluble
Proteína precursora Amiloide	Catepsina A	Elastasa	GPC2
Angiogenina	Catepsina B	EMAP-2	GPVI
Angiopoyetina-1	Catepsina D	EN A-78	Granulinsina
Angiopoyetina-2	Catepsina G	Endostatina	Granzima B
Angiopoyetina-4	Catepsina S	Eotaxina	Gro-a
ANGL3	Catepsina V	Eotaxina-2	Gro-g
ANGL4	CCL28	Eotaxina-3	Receptor de la hormona de crecimiento
Apo A-1	CD5L	Efrina-A4	GSK-3 beta
ApoB	CD22	Efrina-A5	GV
Apo E	CD23	Efrina-B3	GX
ApoE2	CD30	Quinasa celular Epitelial	HAH
Apo E3	Ligando CD30	EPO-R	Haptoglobina, Tipo Mezclado
Apo E4	ANTIGENO CD36	ER	Hat1
APRIL	CD39	ERBB1	HB-EGF
AREG	CD97	ERBB2	HCC-1
ARG11	CD109	ERBB3	HCC-4
ARSB	Ceruloplasmina	ERBB4	HDAC8
ART	CFC1	ERK-1	Hemopexina
Artemina	Chk1	ESAM	Cofactor II Heparina
ASAH2	Ck-b-8-1	Factor B	HGF
ASAHL	CK-BB	Factor D	Histona H12
ATS1	CK-MM	Factor H	HIV-2 Rev
ATS13	Complejo CLF-1/CLC	Factor 1	HMG-1
Aurora quinasa A	Ácido Siálico CMP Sintetasa	Ligando Fas, soluble	HO-2
Azurocidina	CNTF	Fas, soluble	HPLN1
B7	CNTFR alfa	FCG2A	HPVE7 Tipo 16
B7-2	CNTN2	FCG2B	HPVE7 Tipo 18
BAFF	Factor de Coagulación a-XIIa	FCG3B	HSP60
BCAM	Factor de Coagulación IX	FCGR1	HSP70
b-Catenina	Factor de Coagulación IXab	Ferritina	HSP90a
Bcl-2	Factor de Coagulación V	FGF-4	HSP90b
BCMA	Factor de Coagulación VII	FGF-5	HTRA2
BDNF	Factor de Coagulación X	FGF-6	HVEM
b-Endorfina	Factor de Coagulación Xa	FGF7	111 RA
bFGF	Factor de Coagulación XI	FGF-8B	I12R2
bFGF-R	Factor de Coagulación XIa	FGF9	I-309
BGH3	Factor de Coagulación XIII	FGF-10	C3b
b-Glucosidasa	Colágeno Tipo I	FGF-16	ICOS
BGN	COLEC12	FGF-17	IDE
BLC	COMMD7	FGF-18	IDS
BMP-7	Contactina-1	FGF-19	IDUA
BMP-14	Contactina-4	FGF-20	IFN-g
BMPER	COX-2	FGFR-2	IFN-g R1
BMPR1A	Cripto	Fibrinógeno	IFN-lambda 1
BMP RII	CRIS3	Fibronectina	IFN-lambda 2
b-NGF	CRP	Flt-3	IgE
Proteoglicano II óseo	CTACK	Ligando Fit-3	IGFBP-1
BPI	CTGF	Fractalquina/CX3CL-1	IGFBP-2
C1q	CTLA-4	FSH	IGFBP-3
C1r	CXCL16, soluble	FST	IGFBP-4
C2	Cistatina C	FYN	IGFBP-5
C3	Cistatina M	Proteína GA733-1	IGFBP-6
C3a	CYTD	Galectina-2	IGFBP-7
C3adesArg	CYTF	Galectina-3	IGF-1
C3b	CYTN	Galectina-4	IGF-IsR
C3d	Citocromo c	Galectina-7	Receptor IGF-II

FIG. 7 cont.

IgM	Lisozima	P-Caderina	SPINT2
IL-1b	LYVE1	PCNA	Espondina-1
IL-1 R AcP	Receptor manosa de macrófagos	PDGF Rb	sRAGE
IL-1 R4	MAPK14	PDGF-AA	sRANKL
IL-1 sRI	MATN2	PDGF-BB	sTie-1
IL-1F7	MATN3	PD-L2	sTie-2
IL-1Rrp2	MBL	PDPK1	sTREM-1
IL-2	MCP-1	PECAM-1	STX1a
IL-2 sRg	MCP-2	Persefina	Sulfotransferasa, Factor Nod
IL-4	MCP-3	PF-4	suPAR
IL-4 sR	MCP-4	PGRP-S	TAC1
IL-6	M-CSF R	PIGR	TARC
IL-6 sRa	MDC	PKB	tau
IL-7	MEK1	PKC-A	TBP
IL-7R alfa	MEPE	PKC-B-II	TECK
IL-8	MER	PKC-D	Tenascina
IL-10	Met	PKC-Z	Testican-2
IL-10 Rb	METAP1	Plasmina	TF
IL-11	MIA	Plasminógeno	TFPI
IL-12	MICA	PIGF	TGF-b1
IL-12 Rb1	Midquina	Precalicroína	TGF-b2
IL-13	Mif4gd, Ratón	PRL	TGF-bRMI
IL-13 Ra1	MIG	Properdina	Trombina
IL-15 Ra	Miox. Rat	Fosfatasa ácida prostática	Globulina de unión a Tiroxina
IL-16	MIP-1a	Proteasa nexina I	TIG2
IL-17 sR	MIP-1b	Proteína C	TIMP-1
IL-17B	MIP-3a	Proteína S	TIMP-2
IL-17D	MIP-3b	Protrombina	TIMP-3
IL-17E	MK01	PSA	TNFR-I
IL-17F	MMP-1	PSA-ACT	TNFR-II
IL-18 Bpa	MMP-2	P-Selectina	TNFSF15
IL-18 Ra	MMP-3	PSMA	TNFSF18
IL-18 Rb	MMP-7	PTHrP	Tom34
IL-19	MMP-8	PTN	Topoisomerasa I
IL-20	MMP-9	PTP-1B	tPA
IL-21 sR	MMP-13	Inhibidor Disociación Rab GDP beta	Tpo
IL-22	MMP-14	Rac1	TRAIL
IL-27	MMP-17	RAD51	TRAIL R2
Inosina trifosfatasa	MOZ	RANTES	TRAIL R4
IP-10	MP112	RAP	Transferrina
IR	MPIF-1	RELT	TrATPasa
I-TAC	MSPR	Resistina	TrkB
JAM-B	Mieloperoxidasa	RET	TrkC
JAM-C	Cadena reguladora de cadena ligera 2	RGMB	Troponina I
Calicroína 4	NADPH-P450 Oxidorreductasa	RGM-C	Troponina T
Calicroína 5	NANOG	S100A4	Tripsina
Calicroína 8	NAP-2	SAP	Tripsina 2
Calicroína 11	NCAM-L1	SARP-2	TSLP
Calicroína 12	NET4	SCD14	TSLPR
Calicroína 13	NEUREGULINA-1	SCFsR	TSP2
Carioferina-a2	Neurotrofina-3	SCGF-alfa	TSP4
Quininógeno, HMW, Cadena sencilla	Neurotrofina-5	SCGF-beta	TWEAK
Quininógeno, HMW, Dos cadenas	NG36	SDF-1a	UBC9
KLH	Nidógeno	SDF-1b	Ubiquitina+1
KREM2	NKG2D	Semaforina 3A	ULBP-1
Ku70	NKp30	sE-Selectina	ULBP-2
Lactoferrina	NKp44	SET9	ULBP-3
LAG-1	Noggin	sFRP-3	uPA
Laminina	Receptor Nogo	sICAM-2	URB
Lailina	NovH	sICAM-3	VCAM-1
LBP	NPS-PLA2	SIGIRR	VEGF
LD78-beta	NRP1	Siglec-6	VEGFsR2
Leptina	OLR1	Siglec-7	VEGFsR3
Lipocalina 2	ON	Siglec-9	VEGF-C
LKHA4	OPG	SLAMF8	VEGF-D
LRIG3	OSM	s Leptina R	Vitronectina
LRP8	Ligando OX40	SLPI	vWF
LSAMP	PAFAH subunidad beta	sE-Selectina	Wfkn2
Hormona Luteinizante	PAI-1	SMAC	WIF-1
LY86	PAPP-A	sn-1,2-Diacilglicerol Quinasa	WISP-3
LY9	PARC	SOD	XEDAR
Linfotactina	Proteína Auxiliar A	Soggy-1	Yes
Linfotoxina b R	Proteína Auxiliar B	Erizo Sonic	

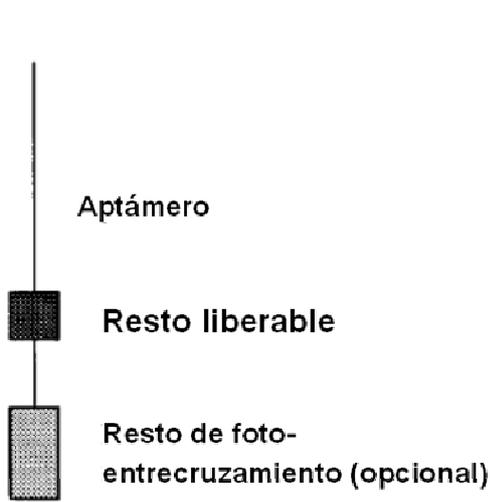


FIG. 8A

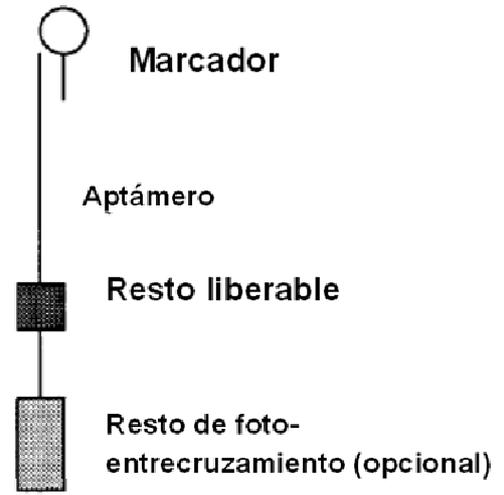


FIG. 8B



FIG. 8C

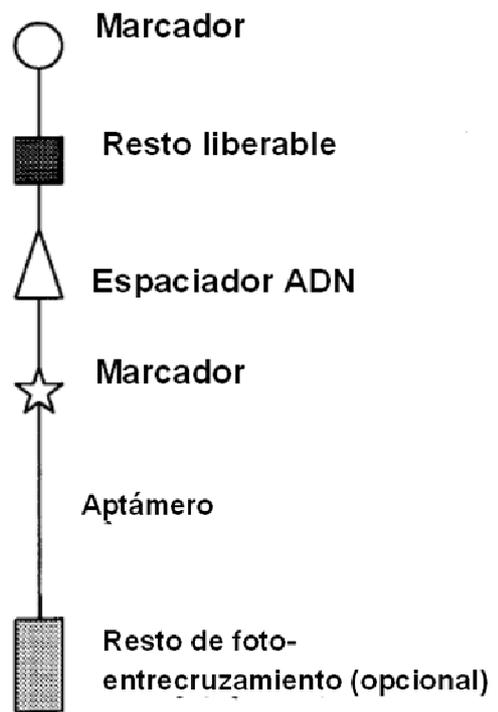


FIG. 8D

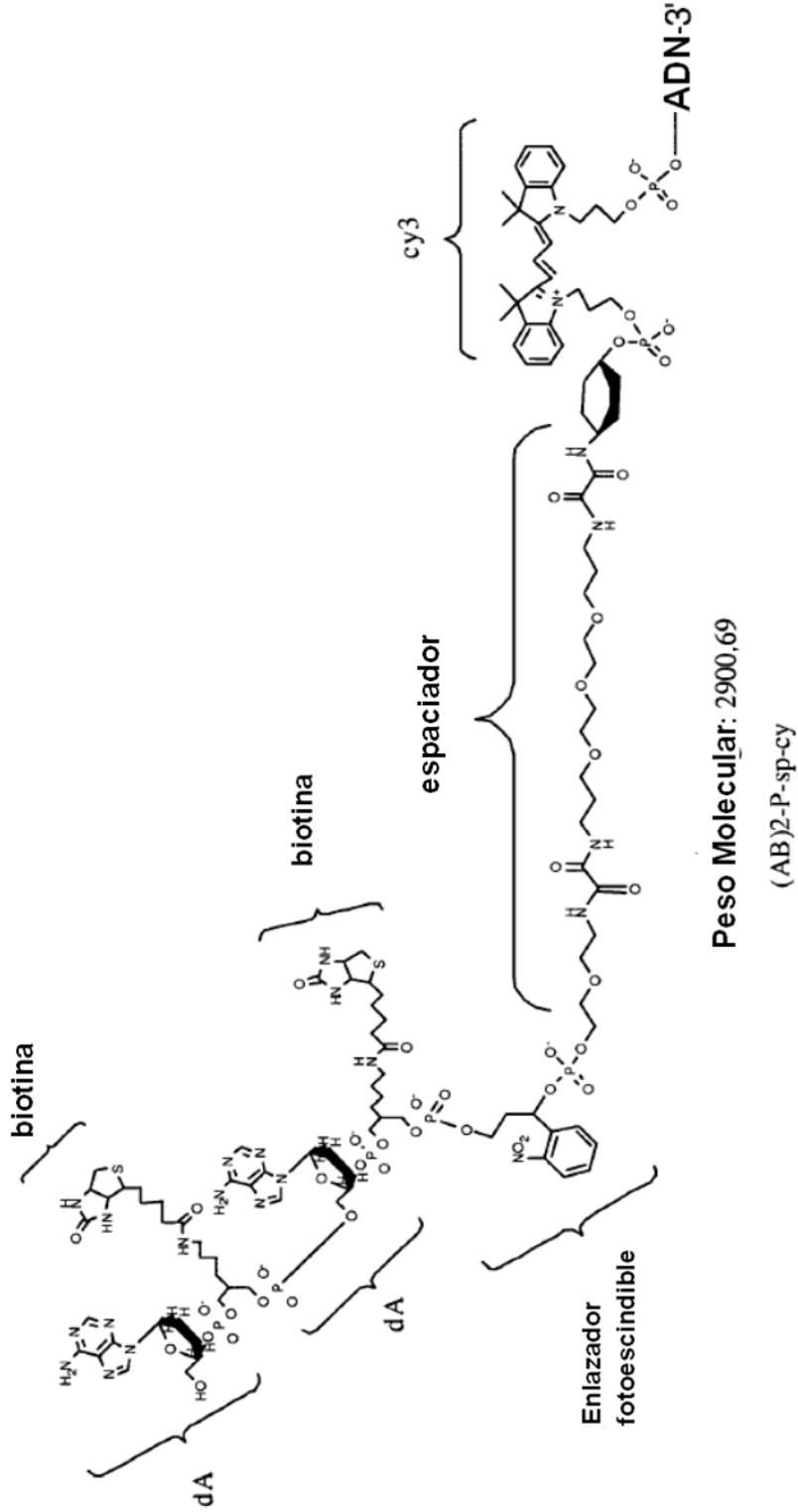


FIG. 9A

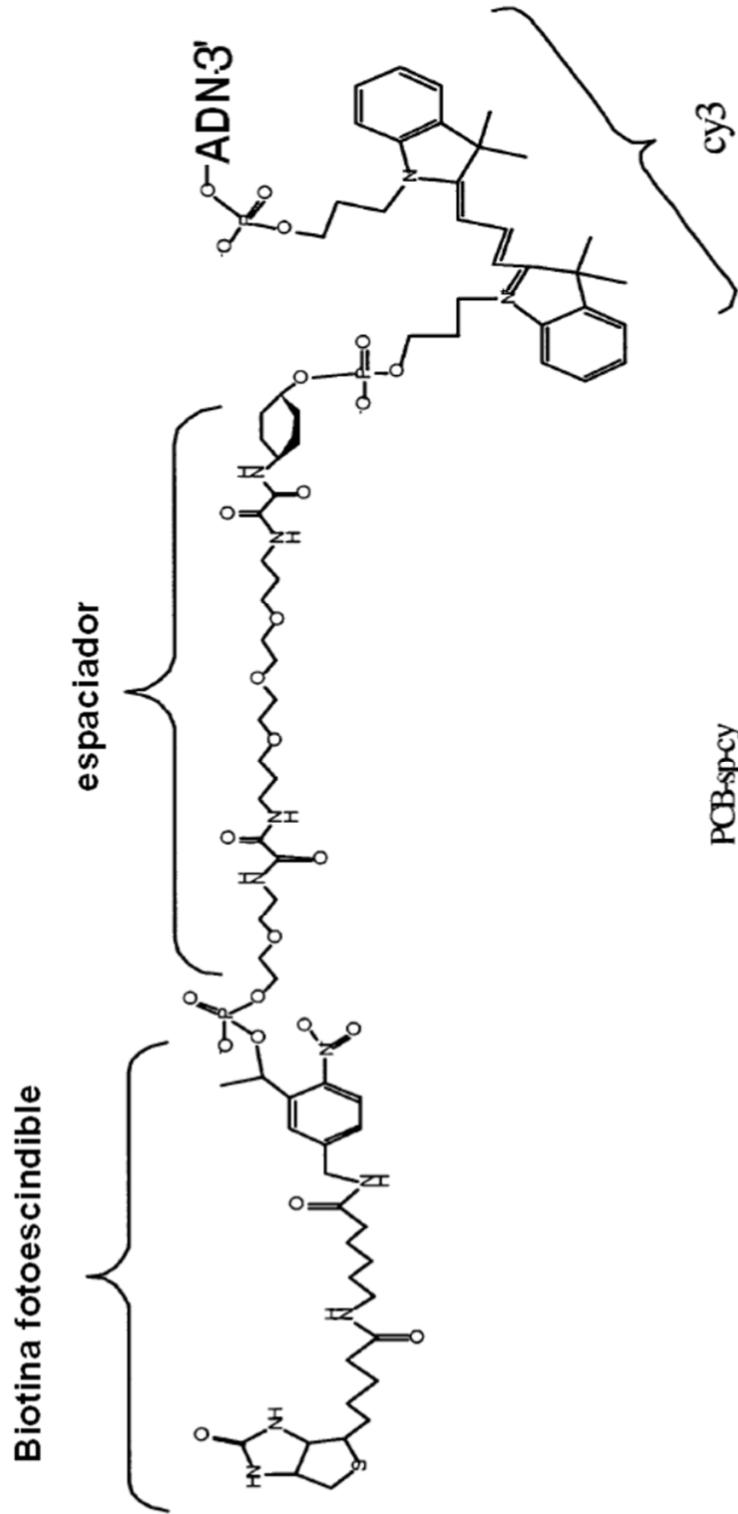


FIG. 9B

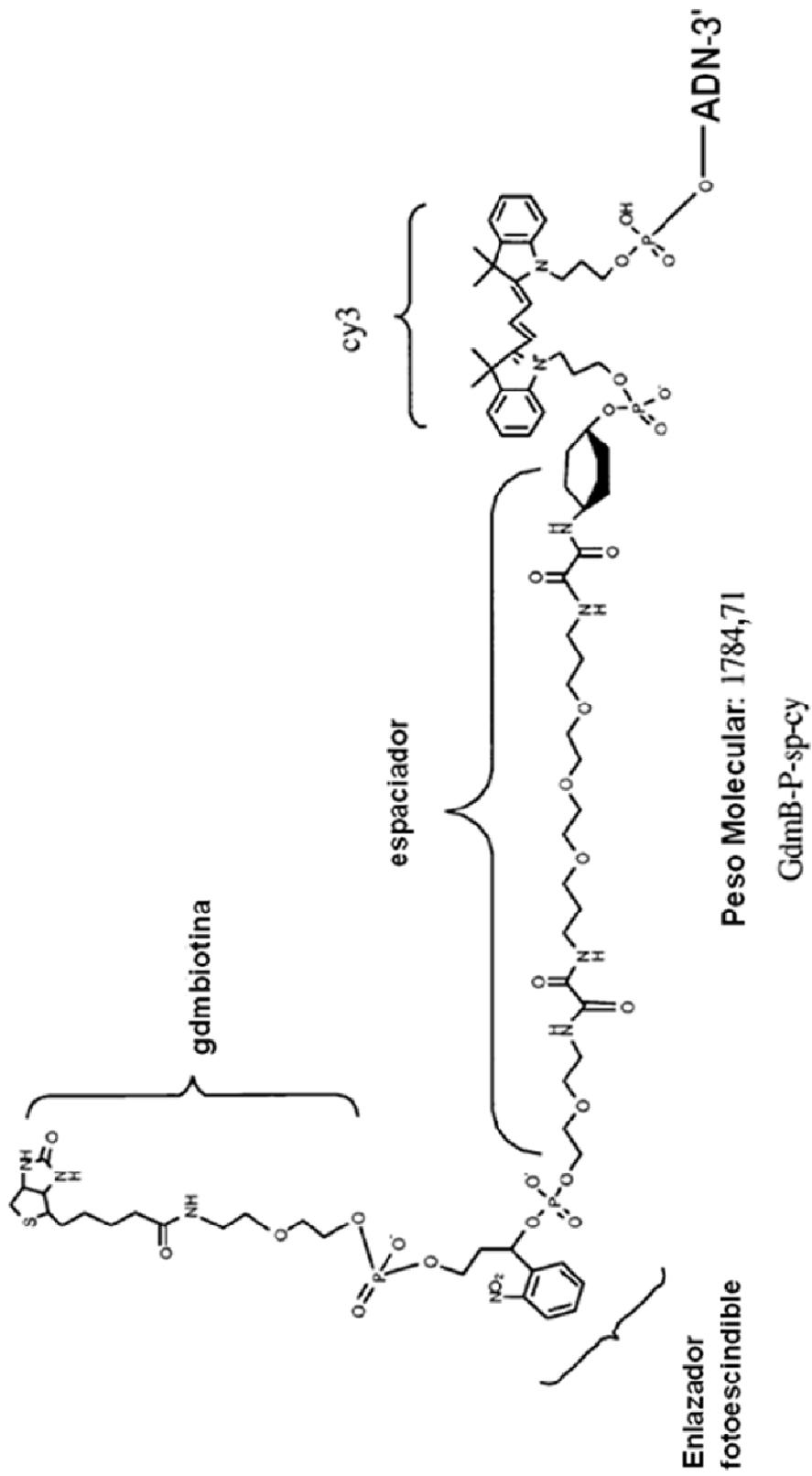


FIG. 9C

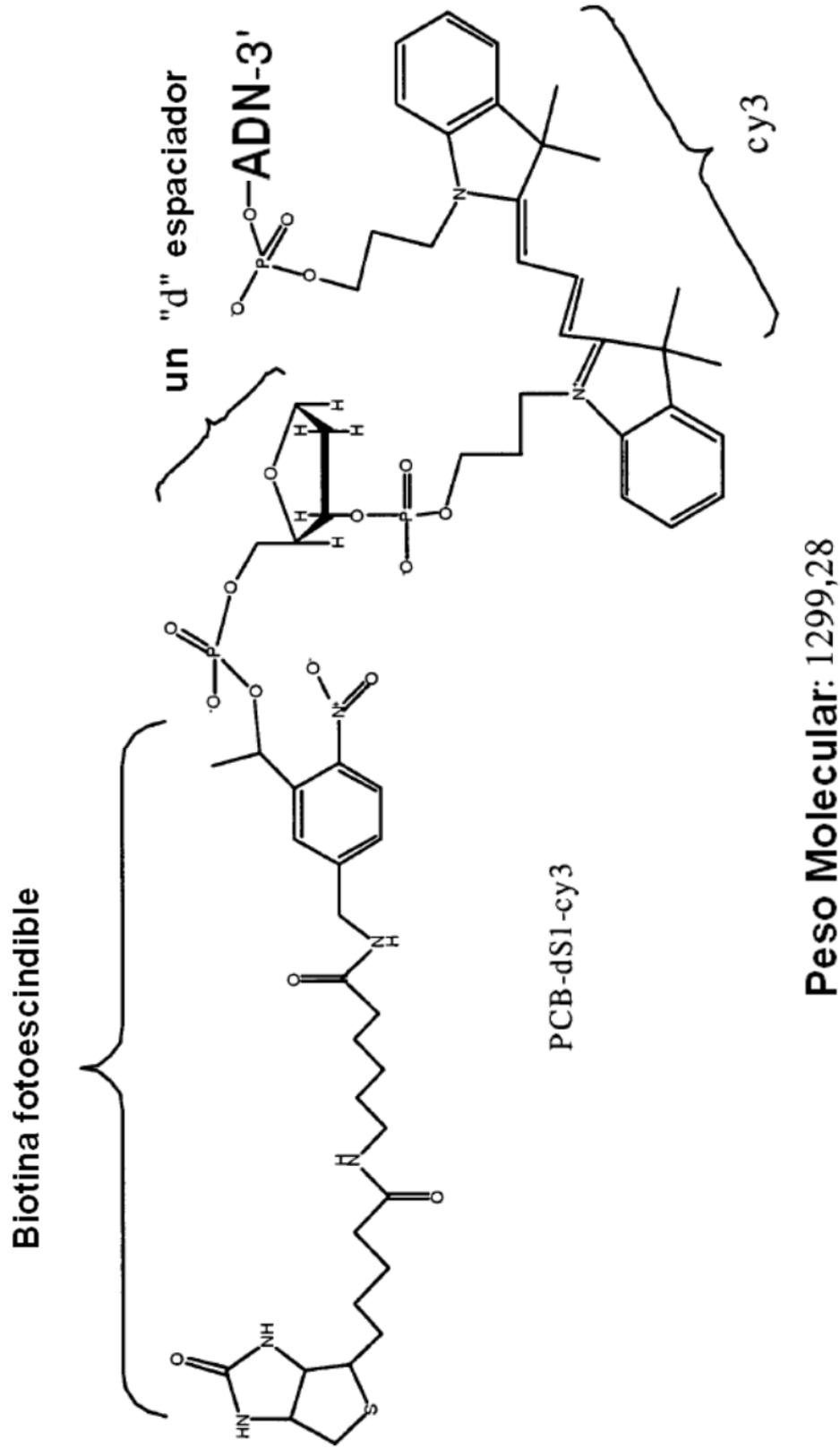
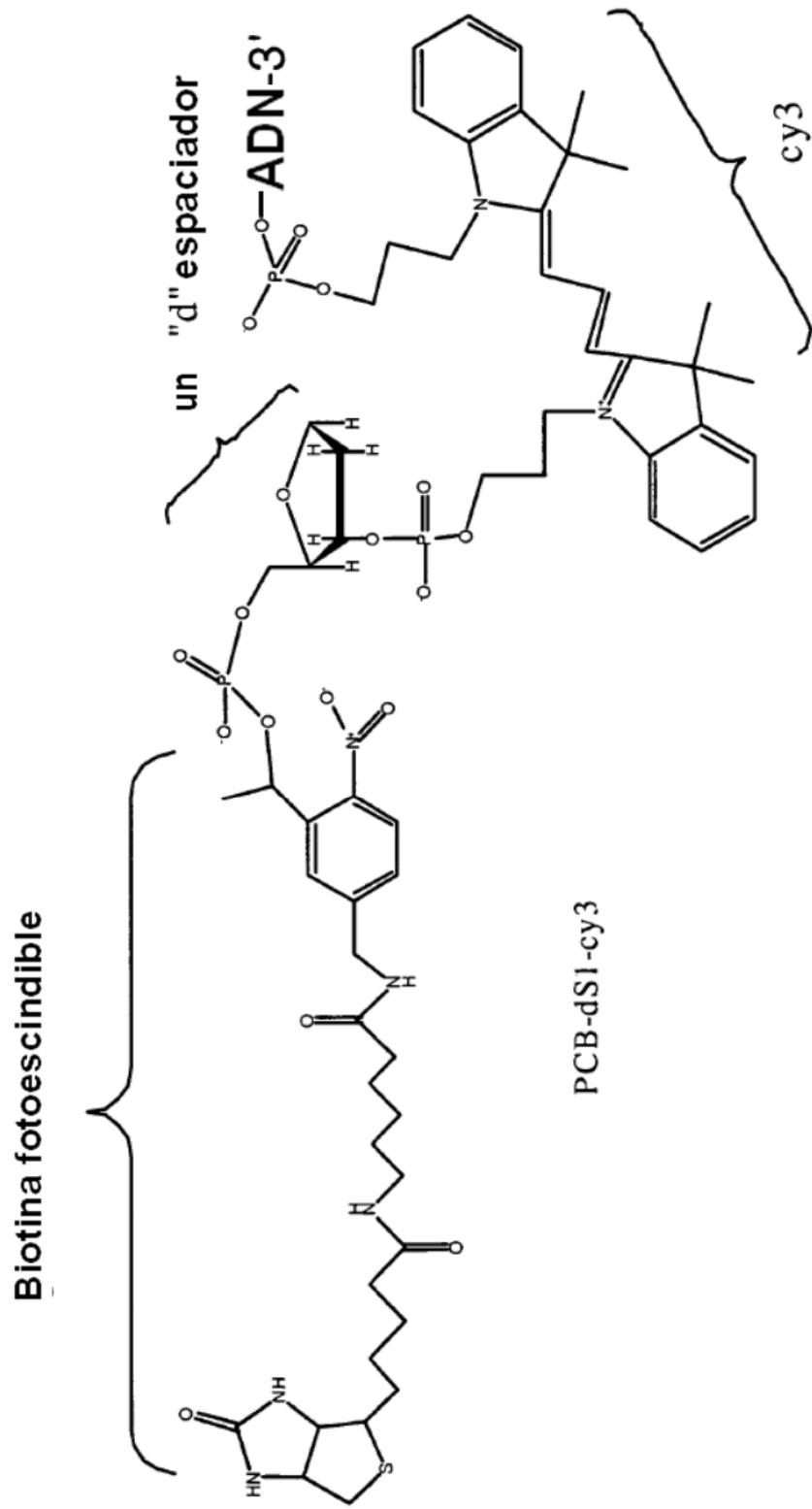


FIG. 9D



Peso Molecular: 1299,28

FIG. 9E

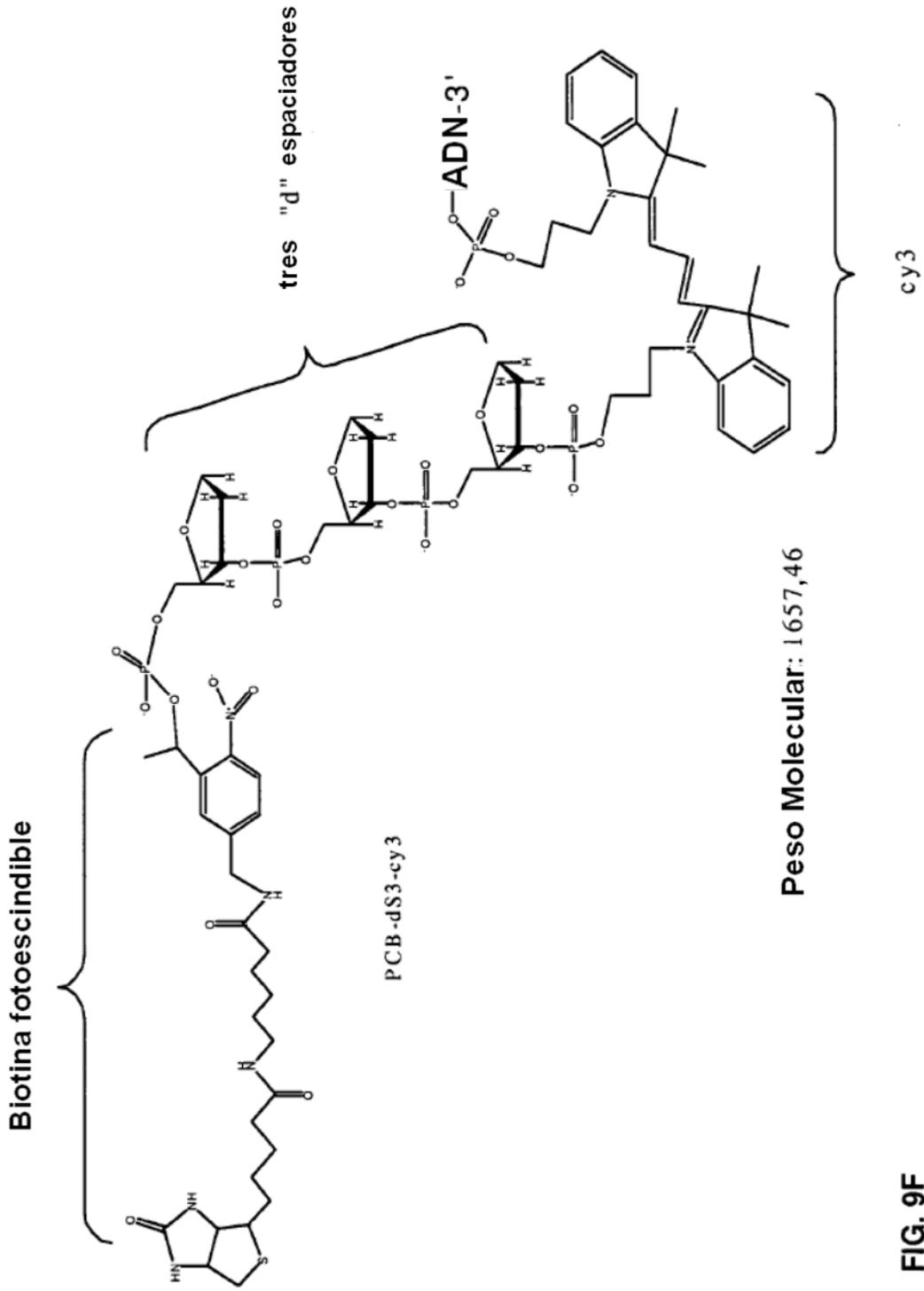


FIG. 9F

FIG. 10

A 5' - CY3 - APTÁMERO - 3'

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

C 5' - ANA - PC - CY3 - APTÁMERO - 3'

D 5' - (AB)₂ - (T)₈ - CEBADOR - 3'

FIG. 11A

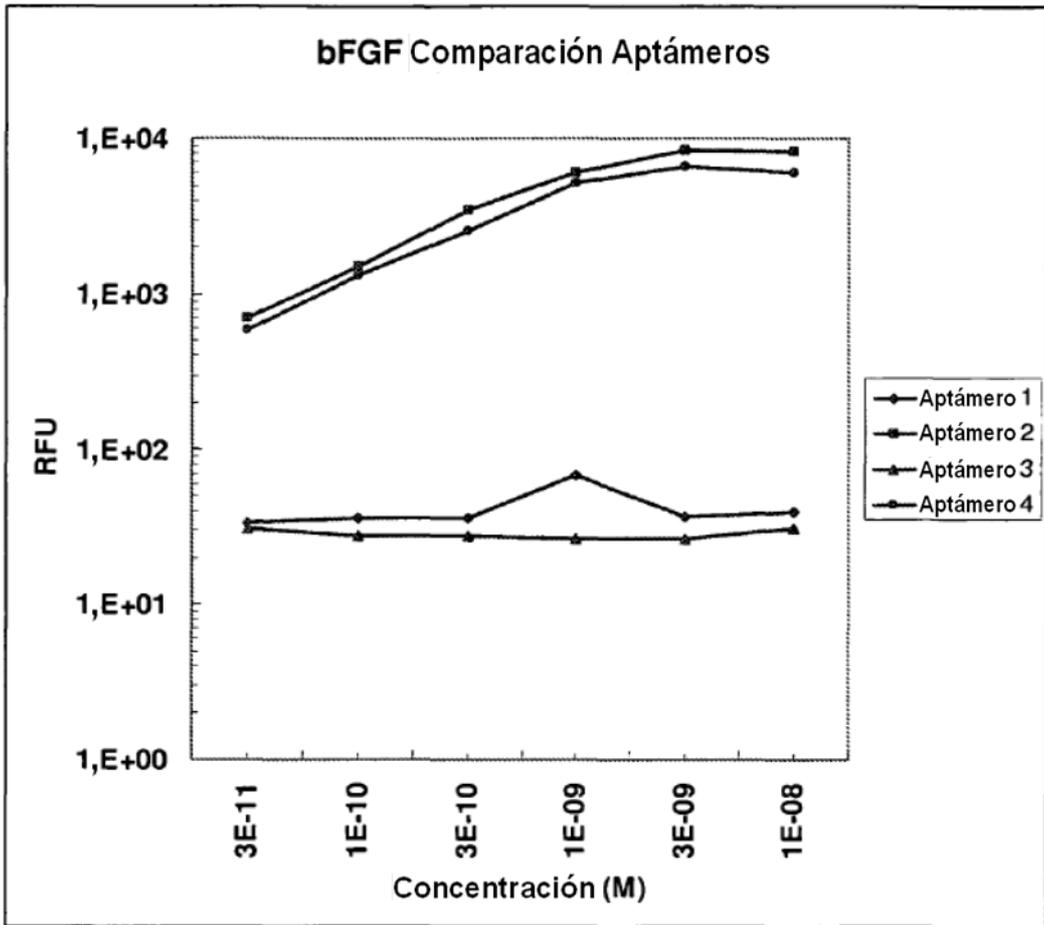


FIG. 11B

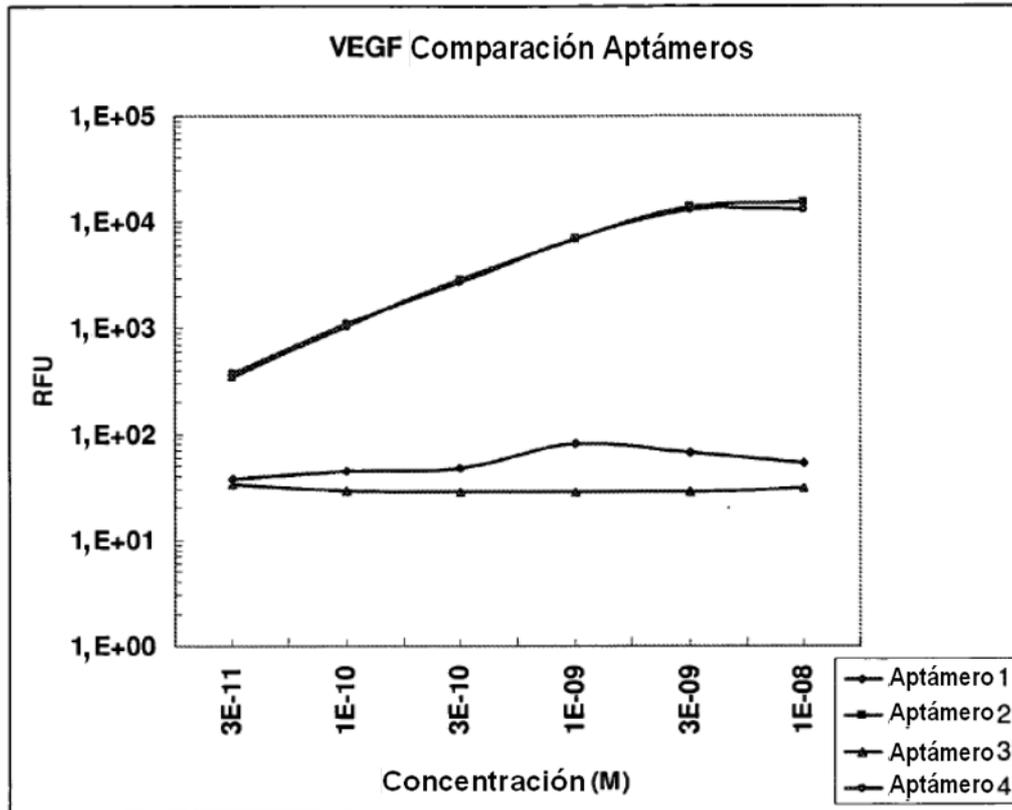


FIG. 11C

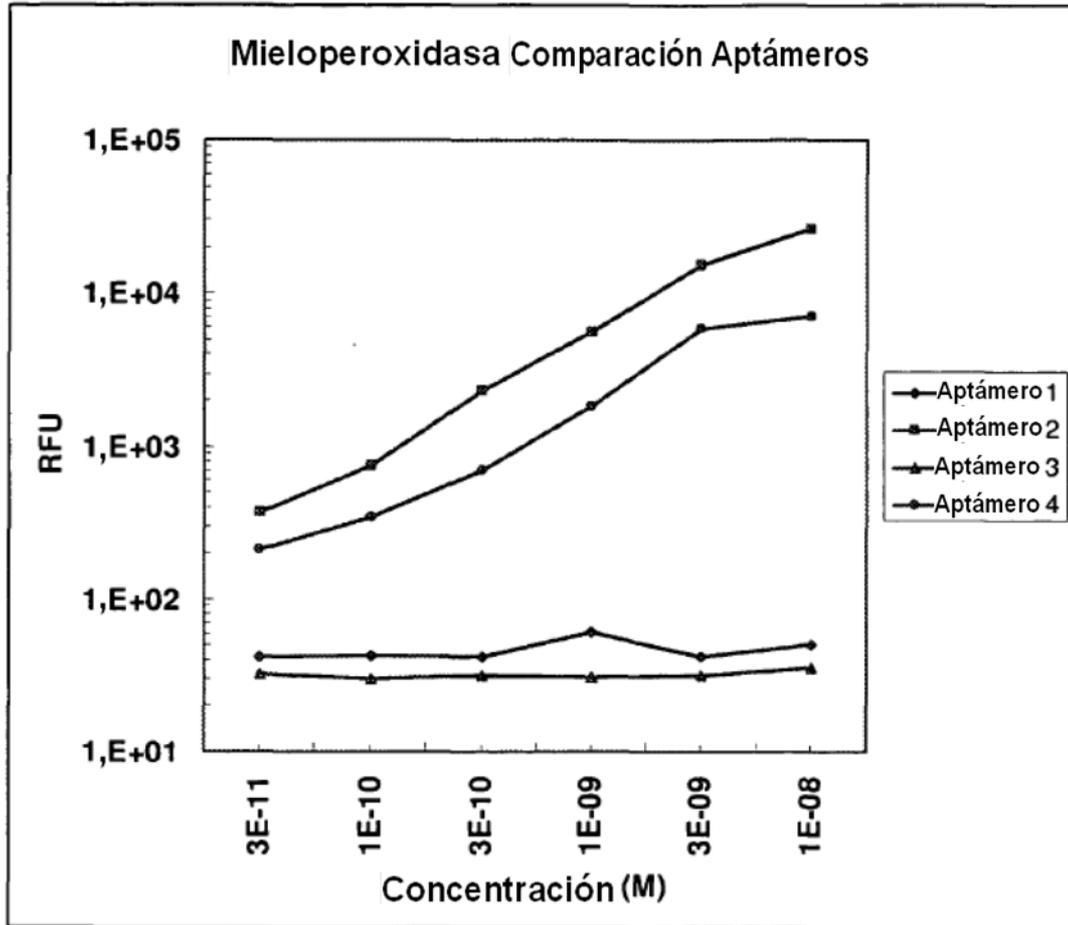


FIG. 12A

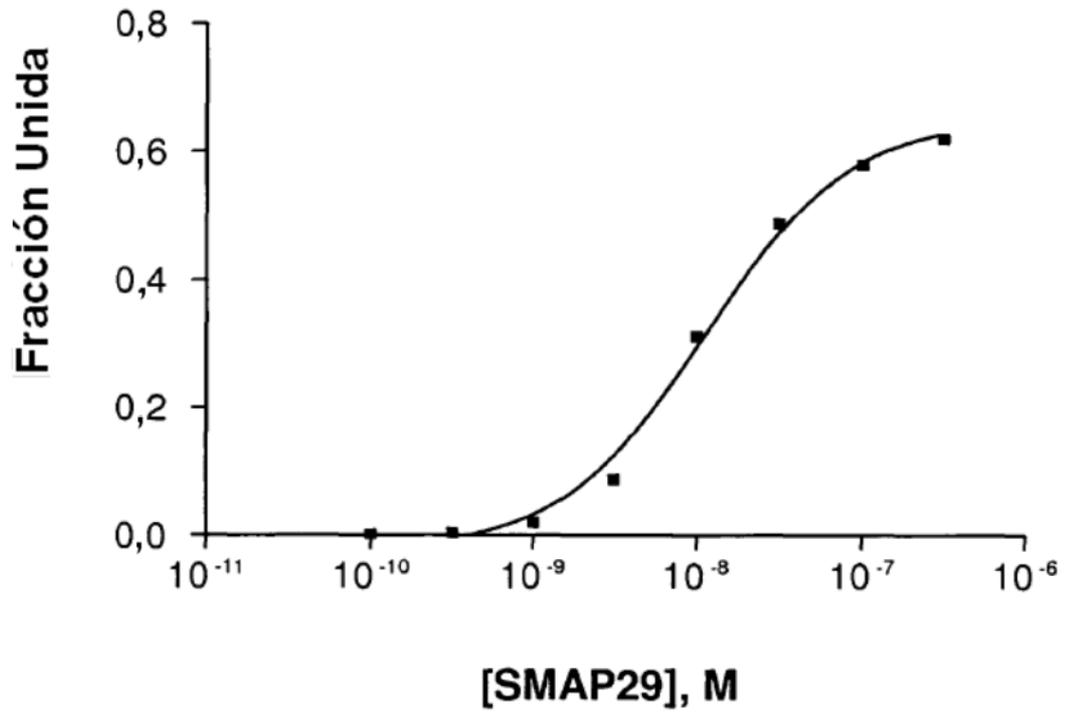


FIG. 12B

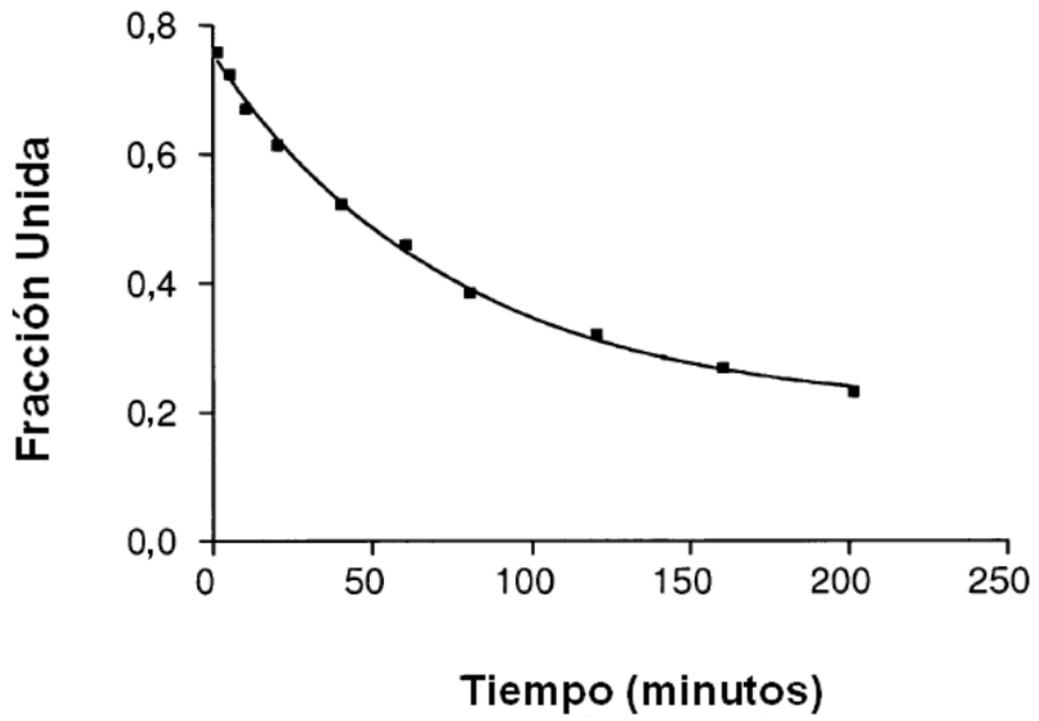


FIG. 13

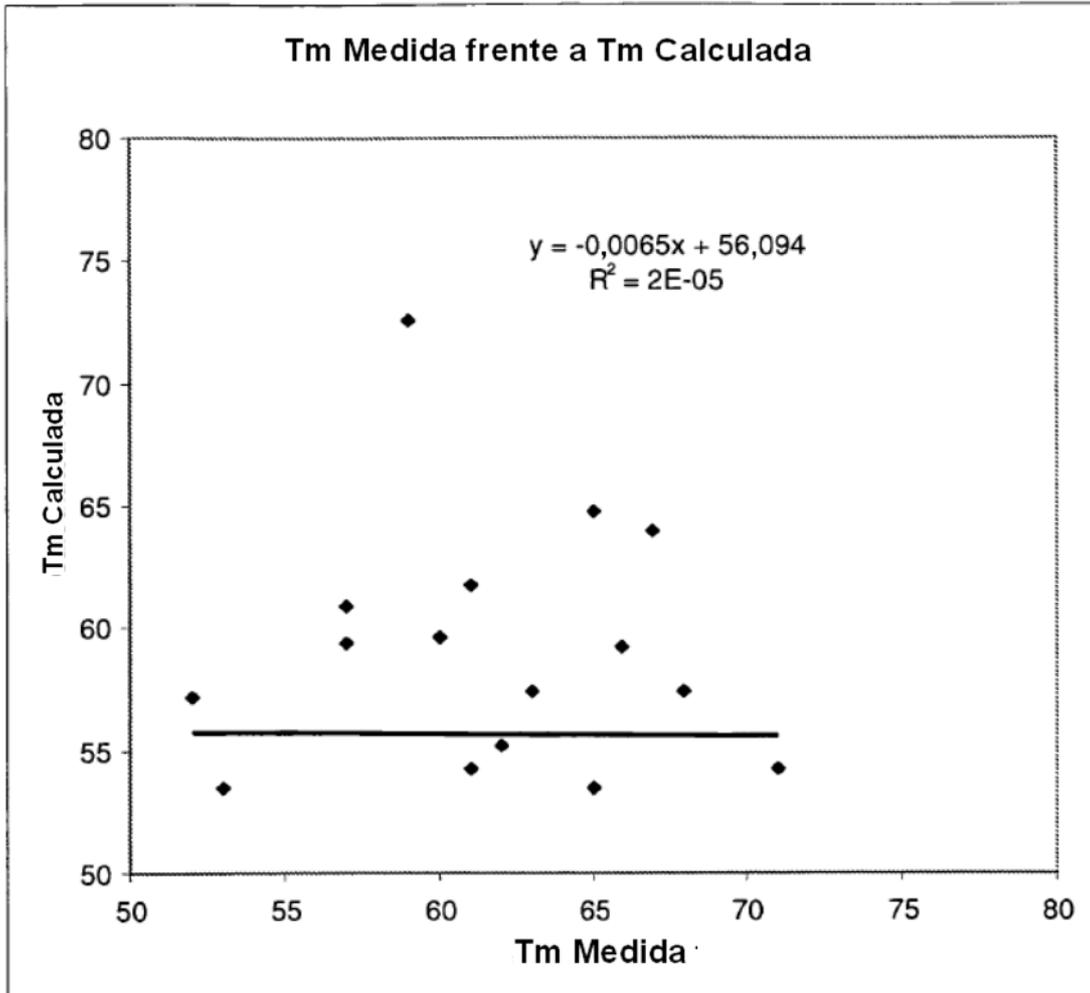
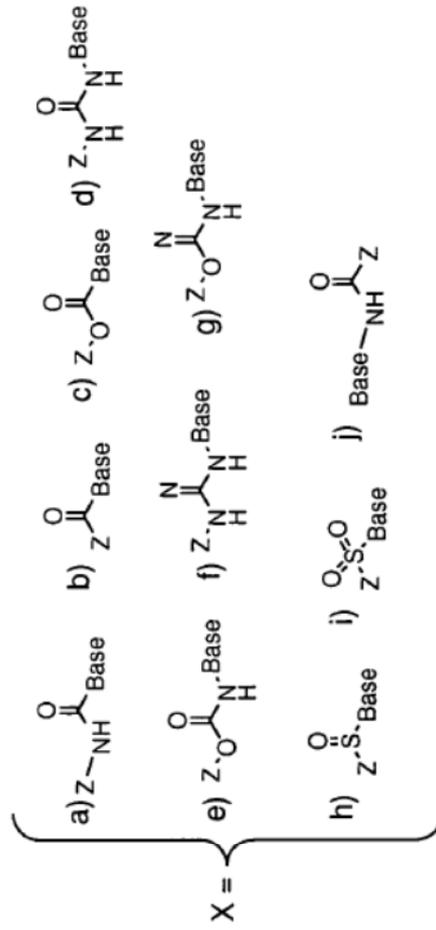


FIG. 14



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

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

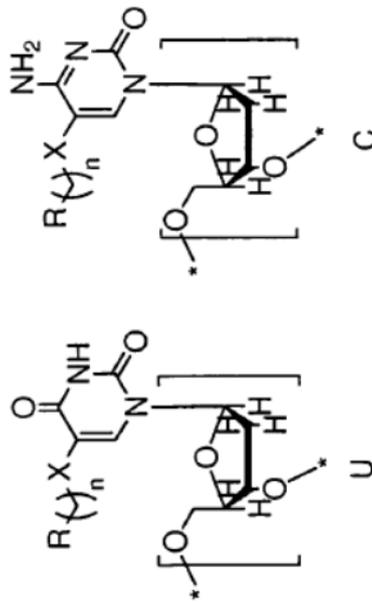


FIG. 14 Cont.

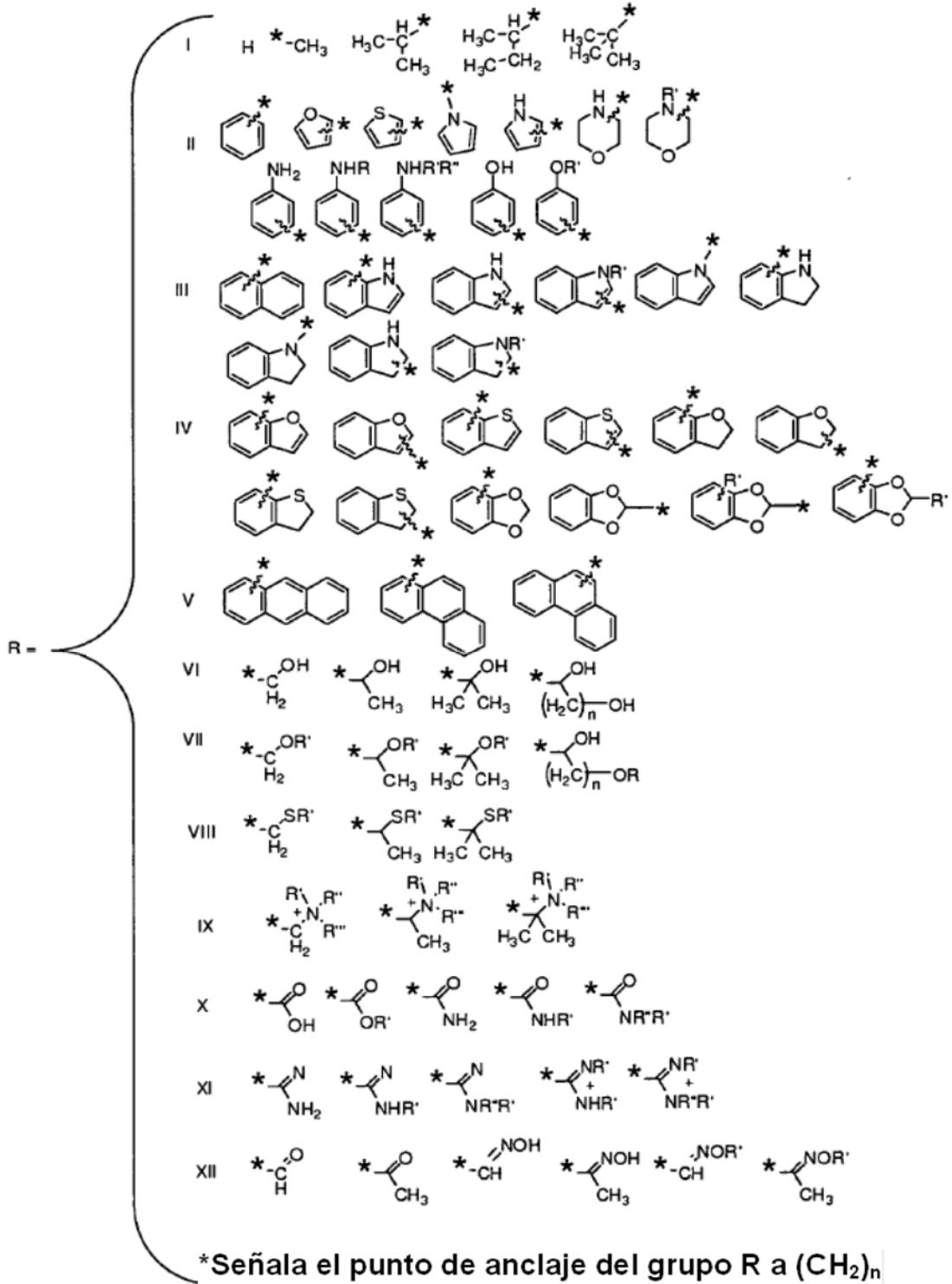


FIG. 15

