

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 324**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/115 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014 PCT/EP2014/071205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014 E 14792753 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3052653**

54 Título: **Un método para identificar o producir un aptámero**

30 Prioridad:

02.10.2013 US 201361885519 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

73 Titular/es:

**TOLLE, FABIAN (25.0%)
Hermann-Wandersleb-Ring 8
53121 Bonn, DE;
FRIEDRICH, FELIX (25.0%);
HECKEL, ALEXANDER (25.0%) y
MAYER, GÜNTER (25.0%)**

72 Inventor/es:

**TOLLE, FABIAN;
FRIEDRICH, FELIX;
HECKEL, ALEXANDER y
MAYER, GÜNTER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 714 324 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un método para identificar o producir un aptámero

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos técnicos de las técnicas para producir oligonucleótidos que se unen específicamente a una diana. La presente invención se refiere a un método para identificar o producir un aptámero.

10 **Antecedentes de la invención**

La evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX, de sus siglas en inglés), también conocida como selección *in vitro* o evolución *in vitro*, es una técnica para producir oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenario que se unen específicamente a un ligando diana. El método SELEX se describe, por ejemplo, en el documento US 5270163. En el método SELEX, una mezcla candidata de ácidos nucleicos monocatenarios que tienen regiones de secuencia aleatoria se pone en contacto con una estructura diana y se seleccionan y amplifican aquellos ácidos nucleicos que tienen una afinidad incrementada con la diana. Después de varias iteraciones, se obtiene un ácido nucleico con buena afinidad con la diana.

20 Philipp M. E. Gramlich et al. describe en Angew. Chem. Int. Ed. 2008, vol. 47, n.º 18, páginas 3442-3444 reacciones de clic para modificación simple a triple del ADN. Anthony D Keefe y Sharon T Cload describen en Current Opinion in Chemical Biology, vol. 12, n.º 4, 2008, páginas 448-456 "SELEX con nucleótidos modificados".

25 Muchas dianas no pueden abordarse con los enfoques SELEX tradicionales. Una razón es la limitada diversidad química de los ácidos nucleicos. El uso de ácidos nucleicos modificados químicamente puede resolver este problema. Sin embargo, los nucleótidos-trifosfatos modificados químicamente a menudo carecen de compatibilidad con los pasos enzimáticos, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés), del proceso de selección *in vitro*. Por lo tanto, las posibles modificaciones químicas de las moléculas de ADN adecuadas para la selección *in vitro* son limitadas. Desde un punto de vista práctico, el uso de tales modificaciones no es fácil de lograr ya que la mayoría de ellas no son accesibles comercialmente y, por lo tanto, requieren una síntesis química laboriosa antes del uso.

30 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método que permita la introducción de entidades químicas adicionales en el ADN durante el proceso de selección.

35 **Sumario de la invención**

Se proporciona un método para identificar o producir un aptámero que comprende los pasos de:

- 40 (a) Preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en donde la mezcla comprende al menos un nucleótido que se modifica para comprender una funcionalización introducida mediante química clic, en donde el nucleótido modificado comprende una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3-dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino, en donde la azida comprende una molécula fotosensible, en donde la molécula fotosensible es un grupo voluminoso que
- 45 inhibe la amplificación por PCR del ligando de ácido nucleico, y en donde la molécula fotosensible comprende una fracción fotoescindible, en donde tras el inicio de la escisión de la fracción fotoescindible mediante irradiación, una molécula modificada con azida-alquino más pequeña que queda permite la amplificación;
- (b) Poner en contacto la mezcla candidata con una muestra diana;
- (c) Partición de ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana de aquellos que no se unen;
- 50 (d) Amplificar los ácidos nucleicos de unión para producir una población de ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana, identificando o produciendo, de este modo, un aptámero.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el método permite introducir entidades químicas adicionales en el ADN durante el proceso de selección. Ventajosamente, la modificación solo está presente de forma transitoria durante el ciclo de selección. Esto permite un alto grado de compatibilidad con el paso enzimático del proceso de selección. Este enfoque permite además introducir entidades químicas más grandes en bibliotecas de ADN que no se pueden utilizar usando los métodos del estado de la materia. El método tiene una amplia aceptación de diversos sustratos de azida, que están disponibles comercialmente o son accesibles mediante síntesis química.

60 El método puede comprender además desplazar una cadena de al menos un ácido nucleico amplificado en el paso (d), y modificar adicionalmente el ácido nucleico para introducir otra funcionalización.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un reactivo que comprende un ligando de ácido nucleico capaz de unirse a una muestra diana, en donde el ligando de ácido nucleico comprende al menos una nucleobase modificada para contener un grupo químico azida-alquino, en donde el grupo químico azida-alquino comprende una molécula fotosensible, en donde la molécula fotosensible es un grupo voluminoso que inhibe la

amplificación por PCR del ligando de ácido nucleico, y en donde la molécula fotosensible comprende una fracción fotoescindible, en donde tras el inicio de la escisión de la fracción fotoescindible mediante irradiación, una molécula modificada con azida-alquino más pequeña que queda permite la amplificación.

- 5 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra una cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) de una azida con una desoxitimidina modificada con 5-C8-alquino.
 La Figura 2 muestra una representación esquemática de una realización del método.
 La Figura 3 muestra una realización de una modificación fotosensible de un grupo químico azida-alquino.
 15 La Figura 4 muestra un diagrama de los resultados de una realización del método dirigido a la MAP-cinasa ERK y que emplea una modificación del indol NPE fotosensible.

- 20 Perfil de interacción de una biblioteca de inicio (barras blancas) y las bibliotecas enriquecidas obtenidas a partir de los ciclos de selección 8 (barras grises) y 10 (barras negras). Las moléculas de ADN se marcaron radiactivamente con ³²P en el extremo 5' y se incubaron con Erk acoplada a partículas magnéticas. Como control, se utilizaron partículas magnéticas no derivadas (perlas vacías). No se detectó unión de las bibliotecas de inicio o de la ronda 10 a las perlas vacías. A su vez, la ronda 10 mostró una unión más fuerte a las perlas de Erk en comparación con la biblioteca de inicio, pero solo su versión pulsada. Esto se refleja en la mayor cantidad de ADN que se podría eluir de las perlas. La fotoescisión de la modificación (10º ciclo escindido) dio como resultado una pérdida de unión.

- 25 La Figura 5 muestra un electroferograma de una serie representativa de rondas 1 a 3 de acuerdo con una realización del método dirigido a la Proteína C Activada (APC, de sus siglas en inglés) Humana. Aunque la concentración de ADN y APC se redujo en un factor de 10, respectivamente, la intensidad máxima que representa el complejo APC/ADN no disminuyó, lo que indica un enriquecimiento de las secuencias de ADN con una afinidad de unión más fuerte a APC.

30

Definiciones

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "aptámero" se refiere a un pequeño oligonucleótido monocatenario que reconoce su diana con alta especificidad y se une a la diana con alta afinidad.

Como se usa en el presente documento, el término "alquino" se refiere a una fracción de carbono insaturado que tiene un triple enlace carbono-carbono entre dos átomos de carbono.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "azida" se refiere a un grupo funcional RN₃. El grupo R se refiere a una modificación química o entidad química adicional que se puede introducir en el ADN. Por ejemplo, el grupo R puede ser una entidad química voluminosa fotoescindible.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo químico de azida-alquino" se refiere a un producto de reacción de un alquino y una azida. La reacción puede ser una cicloadición 1,3-dipolar de la azida con el alquino. Mediante la cicloadición 1,3-dipolar de una azida con un alquino, el enlace de azida-alquino puede ser un enlace triazol.

- 50 Como se usa en el presente documento, la expresión "química clic" se refiere a reacciones bioortogonales conocidas por los expertos en la materia. La expresión "química clic" puede referirse a una cicloadición 1,3-dipolar. Un ejemplo de la química clic es la cicloadición 1,3-dipolar de una azida a un alquino, por ejemplo, utilizando la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) de una azida con un alquino (CuAAC), o la cicloadición de azida-alquino promovida por cepas libres de cobre (SPAAC).

- 55 Como se usa en el presente documento, la expresión "mezcla candidata" se refiere a una mezcla de ácidos nucleicos de diferente secuencia, de la cual se selecciona un ligando deseado. La fuente de una mezcla candidata puede ser de ácidos nucleicos o fragmentos de los mismos de origen natural, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente o ácidos nucleicos preparados mediante una combinación de las técnicas anteriores.

- 60 Como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a un ácido nucleico que se une a otra molécula, por ejemplo, la diana. En una mezcla de ácidos nucleicos candidatos, un ligando se une con mayor afinidad que a de la mezcla en masa. Una mezcla candidata puede comprender más de un ligando para una diana dada. Los ligandos pueden diferir entre sí en sus afinidades de unión para la diana.

- 65 Como se usa en el presente documento, el término "nucleobase" se refiere a los compuestos biológicos que contienen nitrógeno que se encuentran dentro de los nucleótidos de ADN y ARN y los nucleótidos, generalmente

denominados bases. Las nucleobases primarias son citosina (C), guanina (G), adenina (A), timina (T) y uracilo (U). Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a los bloques de construcción básicos de ácidos nucleicos que comprenden o consisten en una nucleobase unida, ribosa o desoxirribosa, y al menos un grupo fosfato.

5 Si no se indica de otra manera, la expresión "ácido nucleico" se refiere a un ácido ribonucleico o un ácido desoxirribonucleico, monocatenario o bicatenario. El aptámero de acuerdo con la invención, por lo tanto, se puede proporcionar en forma de una molécula de ADN o ARN monocatenaria.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra diana" se refiere a cualquier compuesto de interés para el que se desea un aptámero. Una muestra puede ser cualquier material, que probablemente contenga una diana a determinar, incluyendo cualquier muestra líquida o fluida o material sólido, incluida una muestra procedente de una fuente biológica. El término muestra se refiere a polipéptidos, péptidos o pequeñas moléculas orgánicas. El término muestra también se refiere a material biológico, por ejemplo, células, orgánulos celulares o tejidos, o extractos de cualquiera de los anteriores, fluidos biológicos, moléculas biológicas o sobrenadantes.

15 Como se usa en el presente documento, el término "amplificación" se refiere a cualquier proceso o combinación de pasos de procesos que aumenta la cantidad o el número de copias de una molécula, tal como un ácido nucleico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método a modo de ejemplo para la amplificación de ácidos nucleicos.

20 Como se usa en el presente documento, el término "partición" se refiere a cualquier proceso mediante el cual los aptámeros unidos a la muestra diana se pueden separar de los ácidos nucleicos no unidos a la diana. La partición, por ejemplo, se puede lograr mediante la inmovilización de los ácidos nucleicos unidos a la diana en perlas magnéticas o mediante electroforesis capilar de los ácidos nucleicos unidos contra la diana. La elección del método de partición dependerá de las propiedades de la muestra diana y de los ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana y se puede realizar de acuerdo con los principios y propiedades conocidos por los expertos en la materia.

25 Salvo que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

30 Debería observarse que, tal y como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales salvo que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También se debe tener en cuenta que el término "o" se emplea generalmente en su sentido incluyendo "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

40 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para identificar o producir un aptámero que comprende los pasos de:

- 45 (a) Preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en donde la mezcla comprende al menos un nucleótido que se modifica para comprender una funcionalización introducida mediante química clic, en donde el nucleótido modificado comprende una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3-dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino, en donde la azida comprende una molécula fotosensible, en donde la molécula fotosensible es un grupo voluminoso que inhibe la amplificación por PCR del ligando de ácido nucleico, y en donde la molécula fotosensible comprende una fracción fotoescindible, en donde tras el inicio de la escisión de la fracción fotoescindible mediante irradiación, una molécula modificada con azida-alquino más pequeña que queda permite la amplificación;
- 50 (b) Poner en contacto la mezcla candidata con una muestra diana;
- (c) Partición de ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana de aquellos que no se unen;
- 55 (d) Amplificar los ácidos nucleicos de unión para producir una población de ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana, identificando o produciendo, de este modo, un aptámero.

El método permite la introducción de entidades químicas adicionales en el ADN durante el proceso de selección. Ventajosamente, la modificación solo está presente de forma transitoria durante el ciclo de selección. Esto permite un alto grado de compatibilidad con el paso enzimático del proceso de selección. Este enfoque permite además introducir entidades químicas más grandes en bibliotecas de ADN que no se pueden utilizar usando los métodos conocidos. El método tiene una amplia aceptación de diversos sustratos de azida, que están disponibles comercialmente o son accesibles mediante síntesis química.

60 En una realización, el método comprende además desplazar una cadena de al menos un ácido nucleico amplificado en el paso (d), y modificar adicionalmente el ácido nucleico para introducir otra funcionalización.

- Una biblioteca de ADN modificada para comprender una funcionalización, por ejemplo, un grupo químico azida-alquino, se puede incubar con una molécula diana. Después de la incubación, las secuencias no unidas se eliminarán y las moléculas unidas se recuperarán y amplificarán mediante PCR. El método de desplazamiento de una cadena del ácido nucleico se puede hacer de acuerdo con los principios y propiedades conocidos por los expertos en la materia. El ADN monocatenario se puede lograr mediante la digestión selectiva con exonucleasa lambda de una cadena. El ADN resultante se puede modificar nuevamente mediante la reintroducción de la modificación química. Esta biblioteca se puede someter nuevamente a un ciclo de selección *in vitro* hasta que se pueda detectar un enriquecimiento de las secuencias de unión a la diana.
- En un primer ciclo SELEX, en el paso (a) se puede proporcionar una mezcla candidata de ácidos nucleicos que se prepara mediante síntesis química. Cuando se desplaza una cadena de al menos un ácido nucleico amplificado en el paso (d), y se modifica adicionalmente el ácido nucleico para introducir otra funcionalización, por ejemplo, un grupo químico azida-alquino, en los ciclos siguientes, las mezclas candidatas se pueden preparar de forma semi-enzimática.
- En particular, la química clic sobre la base de las cicloadiciones 1,3 dipolares se puede utilizar en sistemas biológicos acuosos para introducir entidades químicas. Se han identificado varios tipos de reacciones que se pueden utilizar para la química clic a través de la cicloadición 1,3-dipolar. La cicloadición 1,3-dipolar de una azida a un alquino ha demostrado ser particularmente útil. Además, la modificación de la nucleobase ha demostrado ser útil en el método. Por lo tanto, en una realización, la mezcla candidata comprende al menos una nucleobase que se modifica para comprender un grupo químico azida-alquino.
- En una realización, el paso de amplificación (d) emplea una reacción en cadena de la polimerasa utilizando una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de la cicloadición 1,3-dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino.
- Los ácidos nucleicos de la mezcla candidata pueden ser ADN monocatenario. La introducción de entidades químicas adicionales en el ADN durante el proceso de selección se puede lograr utilizando una nucleobase modificada con 5 alquinos, por ejemplo, timina. Los nucleótidos-trifosfatos modificados con 5-C8-alquino, por ejemplo, desoxitimidinas, están disponibles comercialmente o se pueden sintetizar. Dichas nucleobases modificadas con 5-C8-alquino, por ejemplo, desoxitimidinas, se pueden introducir en el ADN mediante PCR. La modificación se puede derivar adicionalmente con la llamada química bioortogonal, por ejemplo, utilizando la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) de las azidas respectivas con el alquino. Además de la cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC), también se pueden usar reacciones de cicloadición de azida-alquino promovidas por cepas libres de cobre (SPAAC). En aplicaciones en sistemas celulares o vivos, la cicloadición de azida-alquino promovida por cepas puede superar los problemas de toxicidad asociados con el uso de Cu(I).
- Las bibliotecas de ADN que se modifican de esta manera se pueden emplear para fines de selección *in vitro*. Por lo tanto, esta reacción permite introducir modificaciones químicas en el ADN aplicable en SELEX. De este modo, se puede mejorar la diversidad química de las bibliotecas de ADN.
- En la presente invención, la azida se modifica con una molécula fotosensible. El uso de modificaciones fotosensibles mejora aún más el enfoque hacia los restos voluminosos que se introducirán y utilizarán en el proceso de selección. También permite la selección directa de aptámeros fotosensibles. Esto permite el desarrollo de protocolos de selección completamente nuevos.
- La molécula fotosensible es un grupo voluminoso que inhibe la amplificación mediante PCR. Además, comprende una fracción fotoescindible, y la escisión del grupo voluminoso se puede iniciar mediante irradiación, por ejemplo con luz ultravioleta, y la molécula modificada con azida-alquino más pequeña restante puede estar disponible para la PCR.
- El método se puede aplicar a una amplia variedad de muestras diana. Esto permite una amplia diversidad de muestras que incluyen estructuras biológicas. En una realización, la muestra diana se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido, péptido, célula, fragmento celular, membrana celular, molécula orgánica pequeña, muestra de fluido biológico y una combinación de los mismos. En especial, el método no se limita a muestras purificadas, de polipéptidos, péptidos o pequeñas moléculas orgánicas, sino que se extiende a contextos biológicos altamente complejos tales como muestras de fluidos biológicos o incluso directamente en las membranas de las células.
- Otro aspecto, la invención se refiere un reactivo que comprende un ligando de ácido nucleico capaz de unirse a una muestra diana, en donde el ligando de ácido nucleico comprende al menos una nucleobase modificada para contener un grupo químico azida-alquino, en donde el grupo químico azida-alquino comprende una molécula fotosensible, en donde la molécula fotosensible es un grupo voluminoso que inhibe la amplificación por PCR del ligando de ácido nucleico, y en donde la molécula fotosensible comprende una fracción fotoescindible, en donde tras el inicio de la escisión de la fracción fotoescindible mediante irradiación, una molécula modificada con azida-alquino más pequeña que queda permite la amplificación.

La nucleobase modificada, por ejemplo, puede ser la timina. La modificación se puede lograr mediante la utilización de una desoxitimidina modificada con 5-C8-alquino que se puede introducir en el ADN mediante PCR. La modificación se puede derivar adicionalmente con la llamada química bioortogonal, por ejemplo, utilizando la

5 cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) de una azida respectiva con el alquino.
En la presente invención, el grupo químico azida-alquino comprende una molécula fotosensible. La molécula fotosensible es un grupo voluminoso que inhibe la amplificación mediante PCR del ligando de ácido nucleico. Tras el inicio de la escisión de la fracción fotoescindible mediante irradiación con luz ultravioleta, una molécula modificada con azida-alquino más pequeña que queda permite la amplificación.

10 La invención se explicará con más detalle en virtud de los ejemplos que se exponen a continuación. Si bien se presenta al menos una realización a modo de ejemplo, debe apreciarse que existe un gran número de variaciones. También debe apreciarse que las realizaciones a modo de ejemplo son solo ejemplos, y no pretenden limitar el alcance, aplicabilidad o configuración de ninguna manera. Más bien, la descripción anterior proporcionará a los

15 expertos habituales en la materia las características esenciales de esta invención para implementar al menos una realización a modo de ejemplo, entendiéndose que pueden realizarse diversos cambios sin apartarse del alcance como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

20 La figura 1 muestra una desoxitimidina modificada con 5-C8-alquino que se introduce en el ADN mediante PCR. Esta modificación se puede derivar adicionalmente utilizando la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) de una azida R¹N₃.

25 La figura 2 muestra una representación esquemática de una realización del método. Una biblioteca de ADN modificada para comprender un grupo azida-alquino se incuba con una molécula diana. Después de la incubación, las secuencias no unidas se eliminan y las moléculas unidas se recuperan. La molécula seleccionada se amplifica mediante PCR, utilizando una nucleobase modificada con alquino. El desplazamiento de una sola hebra se logra mediante la digestión selectiva con exonucleasa lambda de una hebra. El ADN resultante se modifica luego de nuevo mediante la cicloadición 1,3-dipolar de una azida RN₃, reintroduciendo, de este modo, la modificación química de un grupo azida-alquino. Esta biblioteca se somete nuevamente a un ciclo de selección *in vitro* hasta que se pueda

30 detectar un enriquecimiento de las secuencias de unión a la diana.

35 La figura 3 muestra una modificación fotosensible. El grupo azida-alquino tiene una molécula fotosensible que se introduce a través del grupo R de la azida. La molécula voluminosa inhibe la amplificación mediante PCR. La irradiación con luz ultravioleta escinde una fracción fotoescindible, y la molécula restante permite la amplificación mediante PCR.

Ejemplos

Material

40

Ácidos nucleicos:			
nombre	especificación	proveedor	
Biblioteca (FT2-N42): CAC GAC GCA AGG GAC CAC AGG NNN CAG CAC GAC ACC GCA GAG GCA; (SEQ ID NO: 1) N: dA, dC, dG, C8-Alquino-dU (1:1:1:1) CAC GAC GCA AGG GAC CAC AGG (SEQ ID NO: 2)			ATDBio, R.U.
Fosfato-TGC CTC TGC GGT GTC GTG CTG (SEQ ID NO: 3)		cebador directo (FT2-F) cebador inverso (FT2-R-P)	Microsynth AG, Suiza Microsynth AG, Suiza

Proteínas:			
nombre	especificación	proveedor	N.º de catálogo
ADN polimerasa <i>Pwo</i>	2,5 U/μl	Genaxxon, Alemania	M3002.0100
λ-Exonucleasa	10 U/μl	Thermo Scientific	EN0562
Proteína C activada humana (APC)		Haematologic Technologies	HCAPC-080; Lote: CC0405-1.0MG
Seroalbúmina bovina (BSA)		Sigma-Aldrich	A9418-10G
Polinucleótido cinasa T4		New England Biolabs	M0201L

Productos químicos:			
nombre	especificación	proveedor	N.º de catálogo
Tris(4-(3-hidroxi-propoil)-[1,2,3]triazol-1-ilmetil)amina		Baseclick, Alemania	BCMI-006-5

45

(THPTA)

Sulfato de cobre 5-(Octa-1,7-diinil)-5'-O-trifosfato-2'-desoxiuridina (Alquino-dUTP)

Sigma-Aldrich
Baseclick, Alemania451657-10G
BCT-05-L

dNTP

Larova, Alemania

250 µM

Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS)

Sigma-Aldrich

D8662-1L

ADN de esperma de salmón

Life Technologies

AM9680

TWEEN® 20

Merck Millipore, Alemania

8170721000

ATP [γ -³²P]- 3000Ci/mmol 10 mCi/ml

Perkin Elmer

BLU002A500UC

Diversos:

nombre	proveedor	N.º de catálogo
Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown	Life Technologies	10103D
soporte para DynaMag™-2 magnetic	Life Technologies	12321D
Gel NucleoSpin® y limpieza de PCR	Macherey-Nagel, Alemania	740609,250

Tampones:

nombre	especificación
tampón SELEX	1x D-PBS + BSA al 0,1 % + esperma de salmón 0,1 mg/ml + Tween20 al 0,01 %
Tampón B15	Tris 25 mM, NaCl 30 mM, KCl 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, MgCl ₂ 1 mM; pH 8,3

5

Ejemplo 1

Síntesis de una azida modificada con una molécula fotosensible: 1-[5-(azidometil)-2-nitrofenil] etil-[2-(1H-indol-3-il)etil]carbamato

10

Paso 1.1 - Síntesis del cloruro de 2-nitro-5-metil-benzoilo

Se disolvieron 25 g (0,14 mol) de ácido 2-nitro-5-metilbenzoico en 200 ml (2,75 mol) de cloruro de tionilo en un matraz para horno. Se añadió una cantidad catalítica de dimetilformamida y la solución se calentó a reflujo durante 3 h en gas inerte. El exceso de cloruro de tionilo se eliminó mediante destilación. El producto se aisló cuantitativamente como un sólido marrón y se utilizó adicionalmente sin caracterización.

15

Paso 1.2 - Síntesis de 2-nitro-5-metil acetofenona

Se calentaron 3,5 g (0,14 mol) de magnesio, 0,33 ml (3,4 mmol) de tetracloruro de carbono y 3,25 ml (56 mmol) de etanol bajo una atmósfera de argón en un matraz para horno. Después del inicio de la reacción, se añadieron gota a gota 130 ml de éter seco. Se añadió una solución de 22,0 ml (0,14 mol) de dietil malonato en 16,6 ml de éter y 13,3 ml adicionales (0,23 mol) de etanol. Posteriormente, la reacción se calentó a reflujo hasta que se consumió el magnesio. A continuación, se añadió una mezcla de 26 g (0,13 mol) de cloruro de 2-nitro-5-metilbenzoilo del paso 1.1 en 32,5 ml de éter seco. La viscosidad de la solución aumentó. Después de detener la agitación, se agregaron 9 ml de ácido sulfúrico en 130 ml de agua. Las fases resultantes se separaron y la fase acuosa se lavó con éter. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio y el disolvente se evaporó. Se obtuvo dietil-5-metil-2-nitrobenzoilo malonato como producto intermedio, y se disolvió en 26 ml de ácido acético puro. Se añadieron 5 ml de ácido sulfúrico. La solución se calentó a reflujo mientras se observó la formación de gas. A continuación, la solución se puso en hielo y se alcalinizó utilizando una solución de hidróxido de sodio. La fase acuosa se extrajo con éter. Las fases orgánicas se secaron con sulfato de magnesio, el disolvente se evaporó y el producto bruto se separó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla 15:1 de ciclohexano:acetato de etilo. Se aislaron 18,1 g (77 %) del producto.

25

30

Paso 1.3 - Síntesis de 5-(bromometil)-2-nitroacetofenona

Se disolvieron 18,1 g (0,10 mol) de 2-Nitro-5-metil acetofenona del paso 1.2 con 18,9 g (0,11 mol) de *N*-bromuccinimida y 2,4 g (10 mmol) de peróxido de dibenzoilo en 60 ml de tetra cloruro de carbono y se calentaron a reflujo durante 16 h. Posteriormente, se añadieron 1,21 g (5 mmol) de peróxido de dibenzoilo y la solución se calentó a reflujo durante otras 8 h. La solución de reacción se filtró luego y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se extrajo con una solución saturada de hidrógeno y sodio y una solución salina. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio, el disolvente se evaporó y el producto se limpió mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla 15:1 de ciclohexano: acetato de etilo. El producto aislado se disolvió en 200 ml de éter y se cubrió con 50 ml de hexano para la cristalización para eliminar la contaminación con productos y eductos dos veces halogenados. El sólido se filtró y se secó al vacío. Se aislaron 9,9 g (41 %) del producto.

40

45

Paso 1.4 - Síntesis de 5-azidometil-2-nitroacetofenona

Se disolvieron 7,76 g (30,2 mmol) de 5-(bromometil)-2-nitroacetofenona del paso 1.3 en 84 ml de acetona y 16 ml de agua, y se agregaron 2,95 g (45,3 mmol) de azida sódica. La reacción se calentó a 75 °C y el proceso de reacción se controló mediante cromatografía en capa fina. Una vez completada la reacción, la acetona se eliminó al vacío y el producto se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución salina, se secó con sulfato de magnesio, el disolvente se evaporó y el residuo se limpió con cromatografía en columna usando un gradiente de ciclohexano:acetato de etilo de 10:1 a 5:1. Se aislaron 4,6 g (69 %) del producto deseado.

Paso 1.5 - Síntesis de 1-[5-azidometil]-2-nitrofenil]etanol

Se disolvieron 4,0 g (18,2 mmol) de 5-azidometil-2-nitro acetofenona del paso 1.4 en una mezcla de 60 ml de metanol seco y 40 ml de dioxano seco. Se añadió 1,0 g (27,2 mmol) de borohidruro de sodio y la mezcla de reacción se agitó en atmósfera gas inerte. El proceso de reacción se controló mediante cromatografía de capa fina. Una vez completada la reacción, se añadieron 160 ml de agua y 6,5 ml de ácido clorhídrico 1 M y el producto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de magnesio, el disolvente se evaporó y el residuo se limpió con cromatografía en columna usando una mezcla 5:1 de ciclohexano:acetato de etilo. Se aislaron 3,66 g (91 %) del producto.

Paso 1.6 - Síntesis del diéster de ácido carbónico 1-[5-(azidometil)-2-nitrofenil]etil-*N*-succinimidil

Se disolvieron 0,65 g (3,0 mmol) de 1-[5-(azidometil)-2-nitrofenil] etanol del paso 1.5 en 6 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron 0,70 ml (5,0 mmol) de trietilamina seguidos de 1,53 g (6,0 mmol) de carbonato de *N,N'*-discuccinimidilo y la solución se agitó en atmósfera gas inerte. El proceso de reacción se controló mediante cromatografía de capa fina. Una vez completada la reacción, se añadieron 10 ml de agua y 0,2 ml de solución saturada de cloruro de sodio y el producto se extrajo en acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de magnesio, se concentró al vacío y, finalmente, se aisló el producto con cromatografía en columna utilizando una mezcla 2:1 de ciclohexano:acetato de etilo. Se aislaron 640 mg (80 %) del producto.

Paso 1.7 - Síntesis de 1-[5-(azidometil)-2-nitrofenil]etil-[2-(1H-indol-3-il)etil] carbamato

Se disolvieron 640 mg (1,8 mmol) de diéster de ácido carbónico 1-[5-(azidometil)-2-nitrofenil]etil-*N*-succinimidil del paso 1.6 en 11 ml de tetrahidrofurano seco. Posteriormente, se agregaron 0,41 ml (2,9 mmol) de trietilamina y 235 mg (1,47 mmol) de triptamina y la solución se agitó durante 24 h en gas inerte. A continuación, se añadieron 55 ml de diclorometano y 170 ml de una solución al 5% de ácido clorhídrico, y se extrajo el producto. La fase acuosa se lavó dos veces con diclorometano y las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se limpió con cromatografía en columna usando un gradiente de ciclohexano:acetato de etilo de 5:1 a 5:3. Se obtuvieron 520 mg (87 %) del producto. Se disolvieron 30 mg del producto en una solución de acetonitrilo al 60 % y 40 % de ácido trifluoroacético al 0,1 % y se limpiaron a través de HPLC en diez ciclos utilizando una columna Nucleosil 100-5 C18 de 250x4,6 mm. El procedimiento comenzó con acetonitrilo al 60 % y 40 % de ácido trifluoroacético al 0,1 % y se enjuagó durante 20 minutos a una relación de 80 %: 20 %. El tiempo de retención del producto 1-[5-(azidometil)-2-nitrofenil]etil-[2-(1H-indol-3-il)etil]carbamato fue de 8,7 minutos.

Ejemplo 2

Síntesis de 3-(2-azidoetil)-1-indol

En una atmósfera de argón, se resolvieron 0,90 g de 3-(2-bromoetil)-1H-indol (4,02 mmol) en 10 ml de DMF seco y se agregaron 0,26 g de azida sódica (4,02 mmol). Después de 15 horas a 25 °C, la solución se lavó secuencialmente con agua. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con acetato de etilo y las soluciones de acetato de etilo combinadas se secaron con MgSO₄ y se concentraron. La cromatografía en columna (acetato de etilo/éter de petróleo 1:9) dio 3-(2-Azidoetil)-1H-indol como un aceite amarillo. El rendimiento fue de 0,52 g (70 %).

Ejemplo 3

El método que se dirige a la proteína cinasa ERK2 activada por mitógenos y que emplea una modificación de indol NPE fotosensible

3.1 - Preparación de una mezcla candidata de ácidos nucleicos

La biblioteca de inicio de ADN monocatenario que comprende 42 posiciones falsas (FT2-N42: CAC GAC GCA AGG GAC CAC AGG NNN CAG CAC GAC ACC GCA GAG GCA; N: dA, dC, dG, C8-Alquino-dU (1:1:1:1)) (SEQ ID NO: 1) se sintetizó y la PAGE se purificó por ATDBio (Southampton, Reino Unido).

La biblioteca se funcionalizó adicionalmente con el indol-NPE-azida fotosensible 1-[5 (azidometil)-2-nitrofenil]etil-[2-(1H-indol-3-il)etil]carbamato preparado de acuerdo con el ejemplo 1 en una cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(I) (reacción de CuAAC) como sigue: se mezclaron 150 µl de una solución de ADN 3,5 µM con 20 µl de D-PBS y 20 µl de solución de azida 10 mM y la reacción se inició mediante la adición de 10 µl de solución de catalizador recién preparada (THPTA 10 mM, CuSO₄ 2 mM, ascorbato de sodio 50 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C, 800 rpm y el ADNmc funcionalizado se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante.

3.2 - Preparación de la muestra diana

Se inmovilizaron 100 µg de ERK2 recombinante marcada con His6 expresados y purificados (His6-ERK2) (gentilmente proporcionados por Sabine Lennarz, Universidad de Bonn) en perlas magnéticas de 5 mg (Dynabeads His-Tag Isolation) en un volumen total de 500 µl de tampón SELEX (1x D-PBS + BSA al 0,1 % + esperma de salmón 0,1 mg/ml + Tween20 al 0,01 %), de acuerdo con la recomendación del fabricante. Las perlas cargadas de ERK se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

3.3 - Puesta en contacto de la mezcla candidata con la muestra diana y partición de los ácidos nucleicos que se unen a ERK2 a partir de aquellos que no se unen

Se calentaron 100 µl (aprox. 500 pmol) de la biblioteca de inicio de ADN pulsada y purificada en el paso 3.1 en 1X D-PBS se calentaron a 95 °C durante 3 minutos y luego se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente. Se agregaron 50 µl (500 µg) de perlas magnéticas no acopladas (en tampón SELEX) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, 800 rpm. El sobrenadante se añadió a 50 µl (500 µg) de suspensión de perlas de ERK2 y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, 800 rpm. El sobrenadante se descartó y las perlas se lavaron 3 veces durante 30 segundos con 200 µl de tampón SELEX. Se añadieron 100 µl de solución de imidazol 300 mM y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C, 800 rpm. Este sobrenadante se utilizó para la posterior amplificación por PCR.

3.4 - Amplificación de los ácidos nucleicos de unión

El ADN eluido (biblioteca enriquecida) se dividió en 8 partes alícuotas y la PCR se amplificó de la siguiente manera: Todas las reacciones de PCR se realizaron en 100 µl de volumen de reacción de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo y ciclo de la tabla 1 en un termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf). Las muestras se sometieron a un ciclo hasta que se pudo detectar la banda del producto deseado en un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio.

Tabla 1:

Reactivo	Concentración madre	Concentración final
Agua		
solución de ADN		
Tampón PWO	10X	1X
dN*TPs	25 mM	250 µM
Cebador D	50 µM	0,5 µM
Cebador I	50 µM	0,5 µM
PWO-Pol.	2,5 U/µl	2,5 U
dN*TPs:	dATP / dCTP / dGTP / C8-alquino-dUTP	

El esquema de ciclos fue el siguiente: 2 min a 95 °C, seguido de 30 segundos a 95 °C / 30 segundos a 62 °C / 1 minuto a 72 °C durante X ciclos, almacenamiento a 4 °C.

Los productos de PCR de ADNbc se purificaron con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y como respaldo de esta ronda SELEX, se almacenó el 10 % del ADNbc purificado a -20 °C.

3.5 - Desplazamiento de una sola hebra

El producto de PCR de ADNbc purificado se complementó con 40 µl de 10X de tampón de reacción de exonucleasa y se agregaron 8 µl de exonucleasa lambda. La mezcla se incubó durante 60 min a 37 °C, 800 rpm y el producto de digestión con ADNmc se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante

3.6 - Funcionalización de la biblioteca enriquecida

Para la siguiente ronda SELEX, la biblioteca monocatenaria enriquecida se funcionalizó nuevamente con la Indol-NPE-Azida fotosensible en una reacción de CuAAC de la siguiente manera: se mezclaron 150 µl de una solución de ADN con 20 µl de D-PBS y 20 µl de solución de azida 10 mM y la reacción se inició mediante la adición de 10 µl de solución de catalizador recién preparada (THPTA 10 mM, CuSO₄ 2 mM, ascorbato de sodio 50 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C, 800 rpm y el ADNmc funcionalizado se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante.

3.7 - 2^a a 10^a ronda SELEX

Se agregaron 10 µl de 10X D-PBS a 90 µl de la biblioteca de ADN enriquecida pulsada (aprox. 50 pmol) y se realizó la siguiente ronda SELEX como se describe para la primera ronda. En total se realizaron 10 rondas SELEX. Para aumentar la presión de selección, se redujo la cantidad de perlas funcionalizadas con ERK2 y se aumentaron los tiempos de lavado como se resume en la siguiente tabla 2:

Tabla 2:

Ronda	Perlas de ERK2 [µl]	Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3
1	50	30 s	30 s	30 s
2	50	30 s	5 min	30 s
3	25	30 s	5 min	30 s
4	12,5	30 s	5 min	30 s
5	5	30 s	5 min	30 s
6	2,5	30 s	5 min	5 min
7/8/9/10	1,25	30 s	5 min	5 min

3.8 - Ensayo de unión radioactiva

La biblioteca enriquecida de la 8^a y 10^a ronda SELEX, así como la biblioteca de inicio, se marcaron radiativamente y se funcionalizaron con indol-NPE-azida de la siguiente manera: se mezclaron 41 µl de ADNmc purificado con 5 µl de tampón de reacción 10 X T4 PNK, 2 µl de T4 PNK y 2 µl de ATP γ 32P y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. El ADN marcado radiactivo se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR kit de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Como control, una muestra de la biblioteca de la 10^a ronda pulsada se irradió con luz ultravioleta (360 nm) durante 5 minutos con el fin de dividir la fracción NPE fotosensible.

Se simuló una ronda SELEX (sin selección negativa) recolectando todas las fracciones (biblioteca residual / Lavado 1/2/3 / Eluido / Perlas). Todas las muestras se llenaron con agua hasta 1 ml y se midió la radioactividad (radiación de Cherenkov) durante 3 minutos en un contador de centelleo (winSpectral 1414; Perkin Elmer).

La Figura 4 muestra un diagrama de los resultados dirigidos a la MAP cinasa ERK. La Figura 4 muestra el perfil de interacción de una biblioteca de inicio, dado como barras blancas, y las bibliotecas enriquecidas obtenidas de los ciclos de selección 8, como barras grises y 10, como barras negras. Como control, se utilizaron partículas magnéticas no derivadas (perlas vacías). Como se puede tomar de la figura 4, no se detectó unión de las bibliotecas de inicio o de la ronda 10 a las perlas vacías. A su vez, la ronda 10 mostró una unión más fuerte a las perlas de Erk en comparación con la biblioteca de inicio, pero solo es a través de la versión modificada de química clic. Esto se reflejó en la mayor cantidad de ADN que se podría eluir de las perlas. La fotoescisión de la modificación (10^o ciclo escindido) dio como resultado una pérdida de unión. Este resultado demuestra que los ácidos nucleicos que se unen a la diana ERK se identificaron con éxito.

Ejemplo 4

El método dirigido a la proteína C activada (APC) humana

4.1 Preparación de una mezcla candidata de ácidos nucleicos

La biblioteca de inicio de ADN monocatenario que comprende 42 posiciones falsas (FT2-N42: CAC GAC GCA AGG GAC CAC AGG NNN CAG CAC GAC ACC GCA GAG GCA; N: dA, dC, dG, C8-Alquino-dU (1:1:1:1)) (SEQ ID NO: 1) se sintetizó y la PAGE se purificó por ATDBio (Southampton, Reino Unido).

La biblioteca se funcionalizó adicionalmente con el indol-azida preparado de acuerdo con el ejemplo 2 en una cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(I) (reacción de CuAAC) como sigue: se mezclaron 150 µl de una solución de ADN 3,5 µM con 20 µl de D-PBS y 20 µl de solución de azida 10 mM y la reacción se inició mediante la adición de 10 µl de solución de catalizador recién preparada (THPTA 10 mM, CuSO₄ 2 mM, ascorbato de sodio 50 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C, 800 rpm y el ADNmc funcionalizado se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante.

4.2 Puesta en contacto de la mezcla candidata con una muestra diana y partición de los ácidos nucleicos que se unen a APC a partir de aquellos que no se unen mediante electroforesis capilar

- 5 Se calentaron 100 µl (aprox. 500 pmol) de la biblioteca de inicio de ADN purificados y pulsados en tampón 1X B15 (Tris 25 mM, NaCl 30 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM; pH 8,3) a 95 °C durante 3 min y luego se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente. La biblioteca de inicio pulsada con indol-azida (concentración final 3 µM) y APC (concentración final 3 µM) se incubaron durante 10 minutos en tampón B15 y se realizaron 3 a 20 minutos de separación de electroforesis capilar como sigue. La biblioteca enriquecida de las 3 operaciones de separación se recogió en 80 µl de tampón B15 para la posterior amplificación mediante PCR.

15 Se utilizó un sistema de electroforesis capilar PA 800 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) con software de 32 Karat (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) y equipado con un capilar de 50 cm de largo y 50 µm de diámetro interno que tiene una longitud de 40 cm al detector. Antes de cada ejecución de EC, el capilar se enjuagó con agua y tampón B15 durante 5 min. El cartucho capilar se mantuvo a 25 °C y la cámara de muestra se mantuvo a 20 °C. Se utilizaron campos eléctricos de 25 kV para impulsar las separaciones por electroforesis. Las muestras (47,5 nl) se inyectaron en el capilar, se llenaron previamente con el tampón de ejecución B15, mediante un pulso de presión de 5 s x 4 psi. Las muestras se monitorizaron utilizando detección UV a 254 nm.

20 4.3 Amplificación de los ácidos nucleicos de unión

La biblioteca enriquecida recibida del paso 4.2 se amplificó mediante PCR de la siguiente manera: Todas las reacciones de PCR se realizaron en 100 µl de volumen de reacción de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo y ciclo de la tabla 3 en un termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf). Las muestras se sometieron a un ciclo hasta que se pudo detectar la banda del producto deseado en un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio.

Tabla 3:

Reactivo	Concentración madre	Concentración final
Agua		
solución de ADN		
Tampón PWO	10X	1X
dN*TPs	25 mM	250 µM
Cebador D	50 µM	0,5 µM
Cebador I	50 µM	0,5 µM
PWO-Pol.	2,5 U/µl	2,5 U
dN*TPs:	dATP / dCTP / dGTP / C8-alquino-dUTP	

- 30 El esquema de ciclos fue el siguiente: 2 min a 95 °C, seguido de 30 segundos a 95 °C / 30 segundos a 62 °C / 1 minuto a 72 °C durante X ciclos, y almacenamiento a 4 °C.

35 Los productos de PCR de ADNbc se purificaron con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante. El primer producto de la PCR se dividió en 16 alícuotas y se amplificó la PCR adicionalmente como se describe anteriormente. Como respaldo de esta ronda SELEX, el 10 % del ADNbc purificado se almacenó a -20 °C.

4.4 Desplazamiento de una sola hebra

- 40 El producto de PCR de ADNbc purificado se complementó con 40 µl de 10X de tampón de reacción de exonucleasa y se agregaron 8 µl de exonucleasa lambda. La mezcla se incubó durante 60 min a 37 °C, 800 rpm y el producto de digestión con ADNmc se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante

45 4.5 Funcionalización de la biblioteca enriquecida

50 Para la siguiente ronda SELEX, la biblioteca monocatenaria enriquecida se funcionalizó nuevamente con Indol-Azida en una reacción de CuAAC de la siguiente manera: se mezclaron 150 µl de una solución de ADN con 20 µl de D-PBS y 20 µl de solución de azida 10 mM y la reacción se inició mediante la adición de 10 µl de solución de catalizador recién preparada (THPTA 10 mM, CuSO₄ 2 mM, ascorbato de sodio 50 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C, 800 rpm y el ADNmc funcionalizado se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante.

4.6 2ª a 5ª ronda SELEX

En total se realizaron 5 rondas de SELEX, siguiendo el mismo protocolo que en la primera ronda. Para aumentar la presión de selección, la concentración de ADN y APC se redujo como se resume en la siguiente tabla 4:

5

Tabla 4:

Ronda	APC [μM]	ADN [μM]
1	3	3
2	0,23	3
3	0,3	0,3
4	0,1	0,06
5	0,3	0,12

10

La Figura 5 muestra el electroferograma de una serie representativa de rondas 1 a 3. Como se puede tomar de la figura 5, aunque la concentración de ADN y APC se redujo en un factor de 10, respectivamente, la intensidad máxima que representa el complejo APC/ADN no disminuyó, lo que indica un enriquecimiento de las secuencias de ADN con una afinidad de unión más fuerte a APC.

LISTADO DE SECUENCIAS

15

<110> Tolle, Fabian
Mayer, Günter
Heckel, Alexander
Friedrich, Felix

20

<120> Un método para identificar o producir un aptámero

<130> UD 40668/SAM

25

<150> US 61/885.519
<151> 02/10/2013

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

30

<210> 1
<211> 84
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> biblioteca

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(63)
<223> n es a, c, g o u

<400> 1

cacgacgcaa gggaccacag gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

45

nnncagcagc acaccgcaga ggca 84

50

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo

55

<400> 2

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar o producir un aptámero, que comprende los pasos de:
 - 5 (a) Preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en donde la mezcla comprende al menos un nucleótido que está modificado para comprender una funcionalización introducida mediante química clic, en donde el nucleótido modificado comprende una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3-dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino, en donde la azida comprende una molécula fotosensible, en donde la molécula fotosensible es un grupo voluminoso que inhibe la amplificación por PCR del ligando de ácido nucleico, y en donde la molécula fotosensible comprende una fracción fotoescindible, en donde tras el inicio de la escisión de la fracción fotoescindible mediante irradiación, una molécula modificada con azida-alquino más pequeña que queda permite la amplificación;
 - 10 (b) Poner en contacto la mezcla candidata con una muestra diana;
 - 15 (c) Separar los ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana de aquellos que no se unen;
 - (d) Amplificar los ácidos nucleicos de unión para producir una población de ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana, identificando o produciendo, de este modo, un aptámero.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende además desplazar una hebra de al menos un ácido nucleico amplificado en el paso (d), y modificar adicionalmente el ácido nucleico para introducir otra funcionalización.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el paso de amplificación (d) emplea una reacción en cadena de la polimerasa utilizando una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3-dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra diana se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido, un péptido, una célula, un fragmento celular, una membrana celular, una molécula orgánica pequeña, una muestra de fluido biológico y una combinación de los mismos.
- 30 5. Un reactivo que comprende un ligando de ácido nucleico capaz de unirse a una muestra diana, en donde el ligando de ácido nucleico comprende al menos una nucleobase modificada para contener un grupo químico azida-alquino, en donde el grupo químico azida-alquino comprende una molécula fotosensible, en donde la molécula fotosensible es un grupo voluminoso que inhibe la amplificación por PCR del ligando de ácido nucleico, y en donde la molécula fotosensible comprende una fracción fotoescindible, en donde tras el inicio de la escisión de la fracción fotoescindible mediante irradiación, una molécula modificada con azida-alquino más pequeña que queda permite la amplificación.
- 35

Figura 1

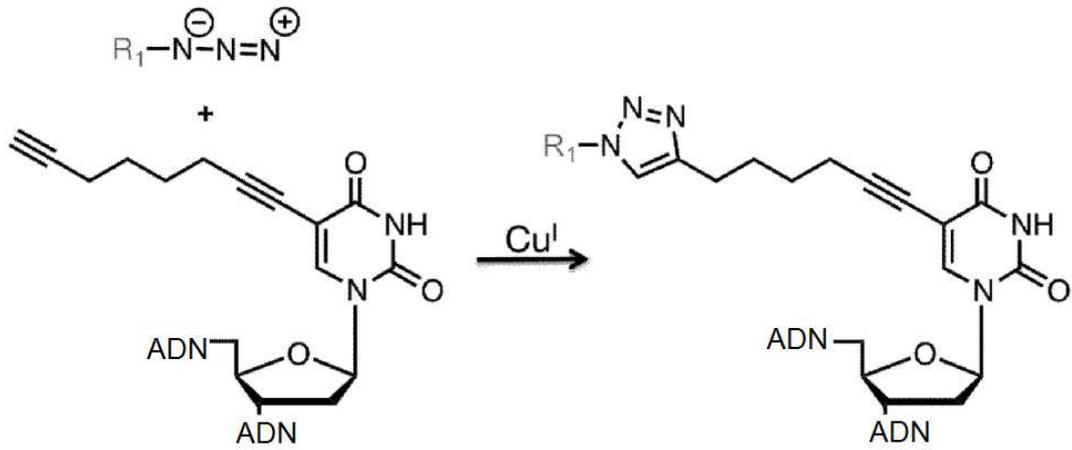


Figura 2

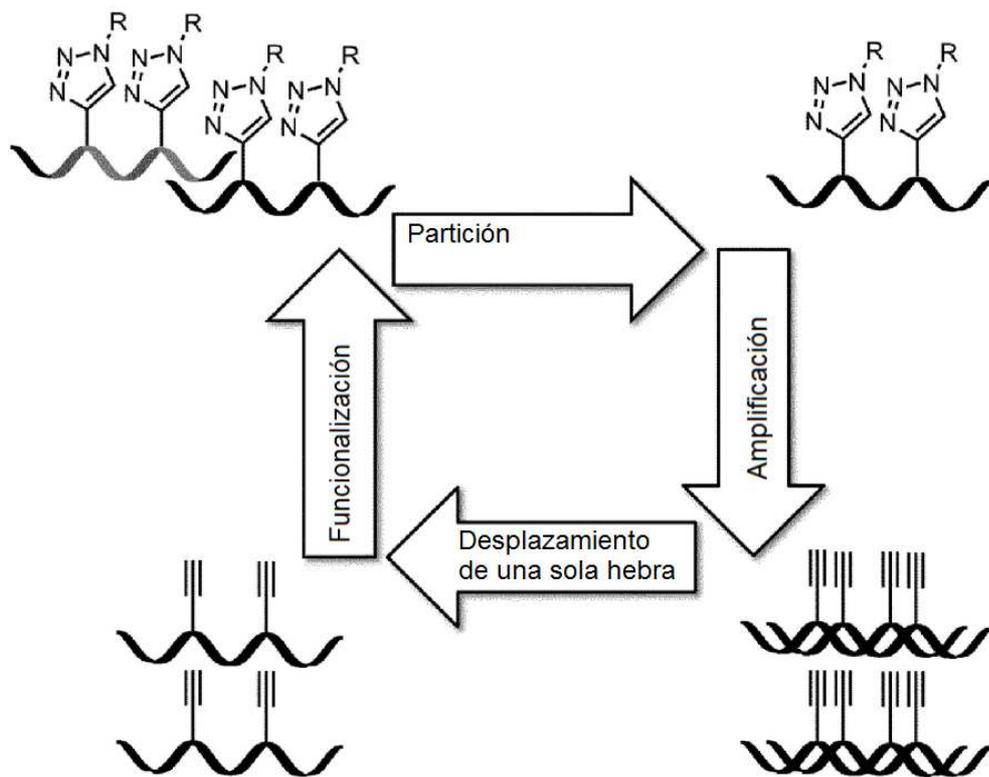


Figura 3

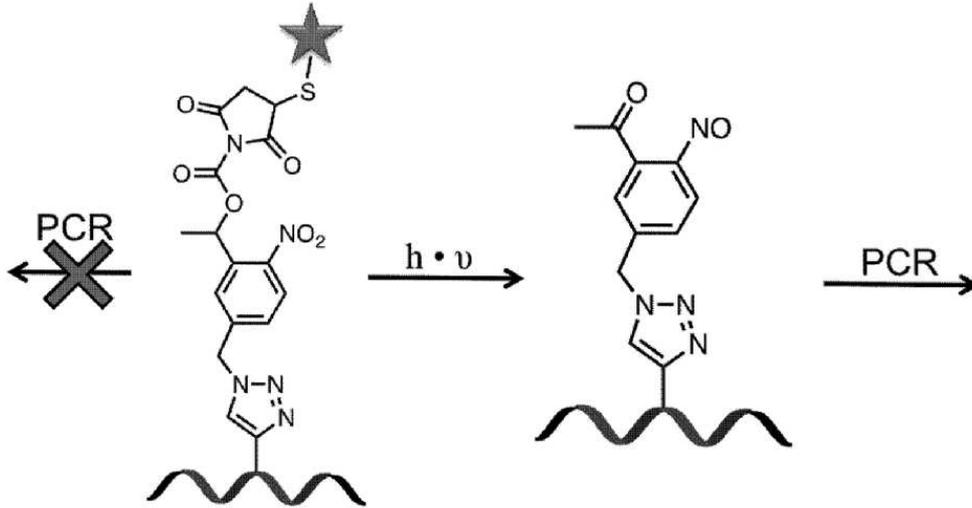


Figura 4

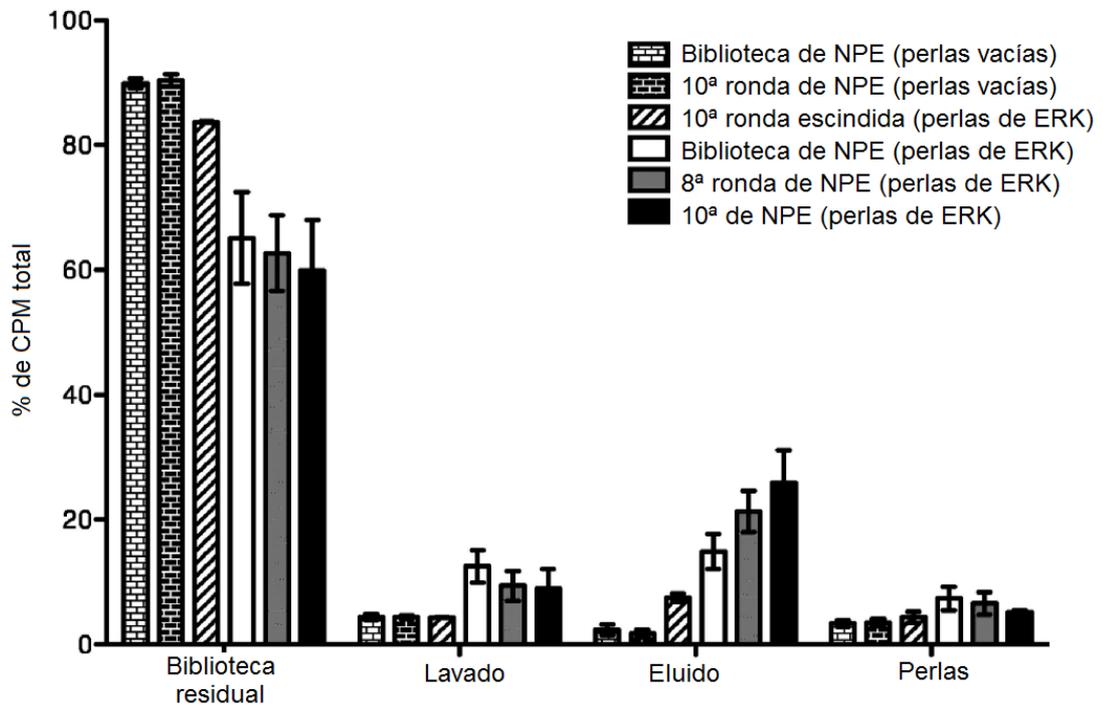


Figura 5

