

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 534**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/115** (2010.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/7115** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2017 E 21174810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 3913058**

54 Título: **Oligonucleótidos que comprenden nucleósidos modificados**

30 Prioridad:

**01.07.2016 US 201662357623 P**

**21.12.2016 US 201662437592 P**

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

**14.04.2025**

73 Titular/es:

**SOMALOGIC OPERATING CO., INC. (100.00%)**

**2945 Wilderness Place**

**Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

**CARTER, JEFF;**

**GAWANDE, BHARAT;**

**JANJIC, NEBOJSA y**

**SCHNEIDER, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones:

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

**ES 3 013 534 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

Oligonucleótidos que comprenden nucleósidos modificados

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere en general al campo de los oligonucleótidos que comprenden nucleósidos modificados, tales como aptámeros que son capaces de unirse a moléculas diana. En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a oligonucleótidos, tales como aptámeros, que comprenden más de un tipo de nucleósido modificado en la base, y métodos para preparar y usar dichos aptámeros.

**Antecedentes**

Los nucleósidos modificados se han usado como agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico, y para su incorporación en oligonucleótidos para mejorar sus propiedades (por ejemplo, estabilidad).

SELEX (*Systematic Evolution of Ligands for EXponential Enrichment*, Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial) es un método para identificar oligonucleótidos (denominados "aptámeros") que se unen de manera selectiva a moléculas diana. El proceso SELEX se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5.270.163. El método SELEX implica la selección e identificación de oligonucleótidos a partir de una mezcla aleatoria de oligonucleótidos para lograr prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Al introducir tipos específicos de nucleósidos modificados en los oligonucleótidos identificados en el transcurso del proceso SELEX, la estabilidad de la nucleasa, la carga neta, la hidrofobicidad o la lipofobicidad pueden alterarse para proporcionar diferencias en la estructura tridimensional y las capacidades de unión a la diana de los oligonucleótidos.

El documento WO2011/109642 describe aptámeros que comprenden una de tres uridinas modificadas en la posición 5 diferentes, tales como las bencil- o naftil-uridinas y una citidina modificada en la posición 5 (5-metil-dCTP). El documento WO2015/077292 describe aptámeros que comprenden citidinas modificadas en la posición 5 que se modifican con varios grupos tales como morfolino, bencilo o restos naftilo.

El documento WO 2011/129494 A1 describe aptámeros de oligonucleótidos ricos en G (GRO, por sus siglas en inglés) mejorados específicos de la nucleolina, un método de preparación de los aptámeros y un uso de los aptámeros para diagnosticar y/o tratar una enfermedad asociada a la nucleolina. El documento WO 2015/184372 A1 describe aptámeros capaces de unirse a la proteína del componente 3 del complemento humano (C3). El documento WO 2015/153860 A1 describe métodos y kits para la detección de biomarcadores y la caracterización de la tasa de filtración glomerular (TFG) y/o la función renal.

**Sumario**

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Tal como se define en las reivindicaciones, se proporciona un aptámero que comprende al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5, en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes; en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5; o en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5; en donde la citidina modificada en la posición 5 comprende un resto bencilo en la posición 5 y en donde la uridina modificada en la posición 5 comprende un resto tirosilo en la posición 5. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5. La uridina modificada en la posición 5 comprende un resto tirosilo en la posición 5. La citidina modificada en la posición 5 comprende un resto bencilo en la posición 5. En determinados aspectos de la divulgación, el resto está enlazado de manera covalente en la posición 5 de la base mediante un enlazador que comprende un grupo seleccionado de un enlazador de amida, un enlazador de carbonilo, un enlazador de propinilo, un enlazador de alquino, un enlazador de éster, un enlazador de urea, un enlazador de carbamato, un enlazador de guanidina, un enlazador de amidina, un enlazador de sulfóxido y un enlazador de sulfona. En algunas realizaciones, la citidina modificada en la posición 5 es PPdC. En algunas realizaciones, la uridina modificada en la posición 5 es TyrdU. En algunas realizaciones, la al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 es una PPdC y la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 es TyrdU. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por una enzima de polimerasa. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por ADN polimerasa KOD.

En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero se une a una proteína diana seleccionada de PCSK9, PSMA,

ErbB1, ErbB2, FXN, KDM2A, IGF1R, pIGFIR, a1-antitripsina, CD99, MMP28 y PPIB.

En algunas realizaciones, el aptámero comprende una región en el extremo 5' del aptámero que tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos, en donde la región en el extremo 5' del aptámero carece de pirimidinas modificadas en la posición 5. En algunas realizaciones, el aptámero comprende una región en el extremo 3' del aptámero que tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos, en donde la región en el extremo 3' del aptámero carece de pirimidinas modificadas en la posición 5. En algunas realizaciones, el aptámero tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 80, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 40 a 100, o 40 a 90, o 40 a 80, o 40 a 70, o 40 a 60, o 40 a 50 nucleótidos.

En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero mejoró la estabilidad de la nucleasa en comparación con un aptámero de la misma longitud y secuencia de nucleobases que comprende una pirimidina sin modificar en lugar de cada una de las primeras pirimidinas modificadas en la posición 5 y/o una pirimidina sin modificar en lugar de cada una de la segunda pirimidina modificada en la posición 5. En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero tiene una semivida más larga en el suero humano en comparación con un aptámero de la misma longitud y secuencia de nucleobases que comprende una pirimidina sin modificar en lugar de cada una de las primeras pirimidinas modificadas en la posición 5 o una pirimidina sin modificar en lugar de cada una de la segunda pirimidina modificada en la posición 5.

Tal como se define en las reivindicaciones, en un aspecto de la divulgación, se proporciona una composición que comprende una pluralidad de polinucleótidos, en donde cada polinucleótido comprende al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5, en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son diferentes. En algunos aspectos de la divulgación, cada polinucleótido comprende una región fija en el extremo 5' del polinucleótido. En algunos aspectos de la divulgación, la región fija en el extremo 5' de cada polinucleótido tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o en aspectos de la divulgación, una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos. En algunos aspectos de la divulgación, cada polinucleótido comprende una región fija en el extremo 3' del polinucleótido. En algunos aspectos de la divulgación, la región fija en el extremo 3' del polinucleótido tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5. En determinados aspectos de la divulgación, el resto está enlazado de manera covalente en la posición 5 de la base mediante un enlazador que comprende un grupo seleccionado de un enlazador de amida, un enlazador de carbonilo, un enlazador de propinilo, un enlazador de alquino, un enlazador de éster, un enlazador de urea, un enlazador de carbamato, un enlazador de guanidina, un enlazador de amidina, un enlazador de sulfóxido y un enlazador de sulfona. En algunos aspectos de la divulgación, la citidina modificada en la posición 5 se selecciona de NapdC, 2NapdC, TyrnC y PPdC. En algunas realizaciones, la uridina modificada en la posición 5 se selecciona de NapdU, PPdU, MOEdU, TyrdU, TrpdU y ThrdU. En algunas, la al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 es una NapdC y la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 se selecciona de NapdU, 2NapdU, PPdU, MOEdU, TyrdU, TrpdU y ThrdU. En algunos aspectos de la divulgación, la al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 es una PPdC y la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 se selecciona de NapdU, 2NapdU, PPdU, MOEdU, TyrdU, TrpdU y ThrdU. En algunos aspectos de la divulgación, la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una TyrdU. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por una enzima de polimerasa. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por ADN polimerasa KOD.

En algunas realizaciones, cada polinucleótido de la composición comprende una región aleatoria. En algunas realizaciones, la región aleatoria tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 20 a 40, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 30 a 40 nucleótidos. En algunas realizaciones, cada polinucleótido tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 80, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 40 a 100, o 40 a 90, o 40 a 80, o 40 a 70, o 40 a 60, o 40 a 50 nucleótidos.

Tal como se define en las reivindicaciones, se proporciona una composición, que comprende un primer aptámero, un segundo aptámero y una diana, en donde el primer aptámero comprende al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5; en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5 o en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una cuarta pirimidina modificada en la posición 5; en donde el primer aptámero, el segundo aptámero y la diana son capaces de formar un complejo trimero; y en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son

pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes.

- 5 En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la uridina modificada en la posición 5 comprende un resto tirosil. En algunas realizaciones, la citidina modificada en la posición 5 comprende un resto bencilo en la posición 5. En determinados aspectos de la divulgación, el resto está enlazado de manera covalente en la posición 5 de la base mediante un enlazador que comprende un grupo seleccionado de un enlazador de amida, un enlazador de carbonilo, un enlazador de propinilo, un enlazador de alquino, un enlazador de éster, un enlazador de urea, un enlazador de carbamato, un enlazador de guanidina, un enlazador de amidina, un enlazador de sulfóxido y un enlazador de sulfona. En algunas realizaciones, la citidina modificada en la posición 5 es PPdC. En algunas realizaciones, la uridina modificada en la posición 5 es TyrdU. En algunas realizaciones, la al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 es una PPdC y la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 es TyrdU. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por una enzima de polimerasa. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por ADN polimerasa KOD.
- 10
- 15
- 20 En algunas realizaciones, la tercera pirimidina modificada en la posición 5 se selecciona de una citidina modificada en la posición 5 y una pirimidina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la tercera pirimidina modificada en la posición 5 y la cuarta pirimidina modificada en la posición 5 son pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes. En algunas realizaciones, la tercera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y la cuarta pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5. En algunos aspectos de la divulgación, la tercera citidina modificada en la posición 5 se selecciona de BndC, PEdC, PPdC, NapdC, 2NapdC, NEdC, 2NEdC y TyrdC. En algunos aspectos de la divulgación, la uridina modificada en la posición 5 se selecciona de BNdU, NapdU, PEdU, lbdU, FBndU, 2NapdU, NEdU, MBndU, BFdU, BTdU, PPdU, MOEdU, TyrdU, TrpdU y ThrdU.
- 25
- 30 En algunas realizaciones, la diana se selecciona de una proteína, un péptido, un carbohidrato, una molécula pequeña, una célula y un tejido.

Se proporciona un método, que comprende:

- 35 (a) poner en contacto un aptámero capaz de unirse a una molécula diana con una muestra;  
 (b) incubar el aptámero con la muestra para permitir que se forme un complejo aptámero-diana;  
 (c) enriquecer el complejo aptámero-diana en la muestra y  
 (c) detectar la presencia del aptámero, del complejo aptámero-diana o de la molécula diana, en donde la detección del aptámero, del complejo aptámero-diana o de la molécula diana indica que la molécula diana está presente en la muestra, y en donde la ausencia de detección del aptámero, del complejo aptámero-diana o de la molécula diana indica que la molécula diana no está presente en la muestra;
- 40 en donde se proporciona un aptámero con modificación doble en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende al menos una etapa adicional seleccionada de: añadir una molécula competidora a la muestra; capturar el complejo aptámero-diana en un soporte sólido; y añadir una molécula competidora y diluir la muestra; en donde la al menos una etapa adicional se produce después de la etapa (a) o la etapa (b). En algunas realizaciones, la molécula competidora se selecciona de un competidor polianiónico. En algunas realizaciones, el competidor polianiónico se selecciona de un oligonucleótido, polidextrano, ADN, heparina y dNTPs. En algunas realizaciones, el polidextrano es sulfato de dextrano; y el ADN es ADN de esperma de arenque o ADN de esperma de salmón. En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona de una proteína, un péptido, un carbohidrato, una molécula pequeña, una célula y un tejido. En algunas realizaciones, la muestra se selecciona de sangre entera, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aire espirado, orina, semen, saliva, líquido meníngeo, líquido amniótico, fluido glandular, fluido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, células, un extracto celular, heces, tejido, una biopsia de tejidos y líquido cefalorraquídeo.
- 45
- 50
- 55

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar una diana, que comprende

- 60 a) poner en contacto la muestra con un primer aptámero para formar una mezcla, en donde el primer aptámero es capaz de unirse a la diana para formar un primer complejo;  
 b) incubar la mezcla en condiciones que permitan que se forme el primer complejo;  
 c) poner en contacto la mezcla con un segundo aptámero, en donde el segundo aptámero es capaz de unirse al primer complejo para formar un segundo complejo;  
 d) incubar la mezcla en condiciones que permitan que se forme el segundo complejo;  
 e) detectar la presencia o ausencia del primer aptámero, del segundo aptámero, de la diana, del primer complejo o del segundo complejo en la mezcla, en donde la presencia del primer aptámero, del segundo aptámero, de la diana, del primer complejo o del segundo complejo indica que la diana está presente en la muestra;
- 65

en donde el primer aptámero comprende al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5;

5 en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5, o en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una cuarta pirimidina modificada en la posición 5;

en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes.

10 En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5. La uridina modificada en la posición 5 comprende un resto tirosilo en la posición 5. La citidina modificada en la posición 5 comprende un resto bencilo. En determinados aspectos de la divulgación, el resto está enlazado de manera covalente en la posición 5 de la base mediante un enlazador que comprende un grupo seleccionado de un enlazador de amida, un enlazador de carbonilo, un enlazador de propinilo, un enlazador de alquino, un enlazador de éster, un enlazador de urea, un enlazador de carbamato, un enlazador de guanidina, un enlazador de amidina, un enlazador de sulfóxido y un enlazador de sulfona. En algunas realizaciones, la citidina modificada en la posición 5 es PPdC. En algunas realizaciones, la uridina modificada en la posición 5 es TyrDU. En algunas realizaciones, la al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 es una PPdC y la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 es TyrDU. En algunas realizaciones, la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una TyrDU. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por una enzima de polimerasa. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por ADN polimerasa KOD.

30 En algunas realizaciones, la tercera pirimidina modificada en la posición 5 se selecciona de una citidina modificada en la posición 5 y una pirimidina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la tercera pirimidina modificada en la posición 5 y la cuarta pirimidina modificada en la posición 5 son pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes. En algunas realizaciones, la tercera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y la cuarta pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5. En algunos aspectos de la divulgación, la tercera pirimidina modificada en la posición 5 se selecciona de BndC, PEdC, PPdC, NapdC, 2NapdC, NEdC, 2NEdC y TyrDC. En algunos aspectos de la divulgación, la uridina modificada en la posición 5 se selecciona de BNdU, NapdU, PedU, lbdU, FbndU, 2NapdU, NedU, MbndU, BfdU, BtdU, PpdU, MOEdU, TyrDU, TrpdU y ThrdU.

40 En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona de una proteína, un péptido, un carbohidrato, una molécula pequeña, una célula y un tejido. En algunas realizaciones, el primer aptámero, el segundo aptámero y la diana son capaces de formar un complejo trímero.

Se proporciona un método para identificar uno o más aptámeros capaces de unirse a una molécula diana, que comprende:

- 45 (a) poner en contacto una biblioteca de aptámeros con la molécula diana para formar una mezcla y permitir la formación de un complejo aptámero-diana, en donde el complejo aptámero-diana se forma cuando un aptámero tiene afinidad por la molécula diana;
- (b) separar el complejo aptámero-diana del resto de la mezcla (o enriquecer el complejo aptámero-diana);
- (c) disociar el complejo aptámero-diana; y
- 50 (d) identificar el uno o más aptámeros capaces de unirse a la molécula diana;

55 en donde la biblioteca de aptámeros comprende una pluralidad de polinucleótidos, en donde cada polinucleótido comprende al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5, en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes. En algunas realizaciones, las etapas (a), (b) y/o (c) se repiten al menos una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces o diez veces.

60 En algunos aspectos de la divulgación, se amplifican el uno o más aptámeros capaces de unirse a la molécula diana. En algunos aspectos de la divulgación, la mezcla comprende una molécula competidora polianiónica. En algunos aspectos de la divulgación, el competidor polianiónico se selecciona de un oligonucleótido, polidextrano, ADN, heparina y dNTPs. En algunos aspectos de la divulgación, el polidextrano es sulfato de dextrano; y el ADN es ADN de esperma de arenque o ADN de esperma de salmón.

65 En algunas realizaciones, la molécula diana se selecciona de una proteína, un péptido, un carbohidrato, una molécula pequeña, una célula y un tejido.

## ES 3 013 534 T3

- En algunos aspectos de la divulgación, cada polinucleótido comprende una región fija en el extremo 5' del polinucleótido. En algunos aspectos de la divulgación, la región fija en el extremo 5' de cada polinucleótido tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos. En algunos aspectos de la divulgación, cada polinucleótido comprende una región fija en el extremo 3' del polinucleótido. En algunos aspectos de la divulgación, la región fija en el extremo 3' del polinucleótido tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos.
- En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5. En algunas realizaciones, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5. La uridina modificada en la posición 5 comprende un resto tirosilo en la posición 5. La citidina modificada en la posición 5 comprende un resto bencilo. En determinados aspectos de la divulgación, el resto está enlazado de manera covalente en la posición 5 de la base mediante un enlazador que comprende un grupo seleccionado de un enlazador de amida, un enlazador de carbonilo, un enlazador de propinilo, un enlazador de alquino, un enlazador de éster, un enlazador de urea, un enlazador de carbamato, un enlazador de guanidina, un enlazador de amidina, un enlazador de sulfóxido y un enlazador de sulfona. En algunas realizaciones, la citidina modificada en la posición 5 es PPdC. En algunas realizaciones, la uridina modificada en la posición 5 es TyrU. En algunas realizaciones, la al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 es una PPdC y la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 es TrydU. En algunas realizaciones, la al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una TyrU. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por una enzima de polimerasa. En algunos aspectos de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son capaces de ser incorporadas por ADN polimerasa KOD.
- En algunas realizaciones, cada polinucleótido comprende una región aleatoria. En algunas realizaciones, la región aleatoria tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 20 a 40, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 30 a 40 nucleótidos. En algunas realizaciones, cada polinucleótido tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 80, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 40 a 100, o 40 a 90, o 40 a 80, o 40 a 70, o 40 a 60, o 40 a 50 nucleótidos.
- En algunas realizaciones, cada polinucleótido es un aptámero que se une a una diana, y en donde la biblioteca comprende al menos 1000 aptámeros, en donde cada aptámero comprende una secuencia de nucleótidos diferente.
- En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un aptámero que se une a la proteína PCSK9. En algunas de dichas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'-yGpppG-3', en donde cada y es una TyrU y cada p es una NapdC. En algunas realizaciones, el aptámero comprende además la secuencia 5'-yEAYGA<sub>n</sub>pAp-3', en donde E se selecciona de y, A y G; y n es 0 o 1. En algunos aspectos de la divulgación, n es 0. En algunas realizaciones, la secuencia 5'-yEAYGA<sub>n</sub>pAp-3' se ubica en 5' de la secuencia 5'-yGpppG-3'. En algunas realizaciones, E es y.
- En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un aptámero que se une a PCSK9, en donde el aptámero comprende la secuencia 5'-F<sub>n</sub>pppAAGRJrpRppW<sub>m</sub>-3' (SEQ ID NO: 81), en donde F se selecciona de r y G; cada R se selecciona independientemente de G y A; J se selecciona de r y A; W se selecciona de r, G y A; n es 0 o 1; m es 0 o 1; r es PpdC; y p es NapdU. En algunos aspectos de la divulgación, m es 1. En algunos aspectos, F es r. En algunos aspectos, J es r. En algunos aspectos, W es G.
- En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un aptámero que se une a PCSK9, en donde el aptámero comprende la secuencia 5'-TTppGGpp-3', en donde cada p es una NapdC.
- En algunos aspectos de la divulgación, un aptámero que se une a PCSK9 tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 80, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 40 a 100, o 40 a 90, o 40 a 80, o 40 a 70, o 40 a 60, o 40 a 50 nucleótidos.
- En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero inhibe la unión de PCSK9 a LDL-R. En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero inhibe la unión de PCSK9 a LDL-R con una  $CI_{50}$  inferior a 30 nM, inferior a 20 nM o inferior a 15 nM.
- En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición para su uso en un método para reducir el colesterol en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un aptámero que se une a PCSK9. En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero que se une a PCSK9 es un aptámero proporcionado en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, el colesterol es colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (LDL-C). En algunos aspectos de la divulgación, el sujeto tiene hipercolesterolemia familiar heterocigota o enfermedad cardiovascular aterosclerótica clínica (CVD).

Lo anterior y otros objetivos, características, y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

### Breve descripción de los dibujos

5 **Fig. 1.** Selección de aptámeros de ácido nucleico modificados con bibliotecas de ADN que contienen trifosfatos de citidina y uridina modificadas en la posición C5. Diagrama esquemático de selección con dos bases modificadas. Esbozo del método de selección en el que se usó una biblioteca molde biotinilada antisentido maestra sintetizada químicamente seleccionada al azar de 30N para sintetizar enzimáticamente varias bibliotecas modificadas y no modificadas por reacciones de extensión de cebadores.

10 **Fig. 2.** Afinidades de unión de aptámeros de 40 mer (30N+5+5) a PCSK9 generadas usando varias bibliotecas modificadas. Los aptámeros con afinidades  $\geq 1$  nM están resaltados en un tono gris y los aptámeros mostrados con una afinidad de 320 nM representan que no hay una unión detectable en una concentración máxima de 32 nM en la curva de unión. La línea negra en cada una de la biblioteca indica el valor de la mediana para todos los aptámeros en esa biblioteca.

15 **Fig. 3.** La afinidad y el porcentaje de número de copias para dU o dC con única modificación vs. dC con dos modificaciones con dU. Cada punto representa uno de los aptámeros con valores de afinidad mostrados en el eje Y y su porcentaje de número de copias en el eje X. Los puntos rojos son aptámeros con única modificación y los puntos verdes (abiertos y rellenos) son aptámeros con dos modificaciones. Los puntos verdes rellenos representan algunos aptámeros Nap-dC/Tyr-dU y PP-dC/Tyr-dU.

20 **Fig. 4A-B.** Truncabilidad de aptámeros con una única base modificada y con dos bases modificadas. **(A)** Todas las secuencias de 40 mer de alta afinidad se truncaron además a 30 mer hasta su longitud de región aleatoria eliminando únicamente 5 nucleótidos de cada uno de los extremos 5' y 3'. El porcentaje de aptámeros que conservan o mejoraron la afinidad de unión a PCSK9 se muestra en un gráfico en el eje Y. **(B)** Comparaciones de afinidad y truncabilidad de aptámeros con una única base modificada y con dos bases modificadas de cada biblioteca individual. Los aptámeros con afinidades  $\geq 1$  nM están resaltados en un tono gris, las afinidades promedio más altas fueron para los aptámeros con combinaciones de dos bases modificadas de PP-dC con PP-dU, Nap-dU y Tyr-dU.

25 **Fig. 5.** Especificidad de unión diana de tres aptámeros de alta afinidad para cada biblioteca a otras proproteína convertasas (PCs). Las mediciones de afinidad de solución se llevaron a cabo para un total de treinta y tres aptámeros (40 mers), con once aptámeros teniendo una única base modificada (es decir, tres aptámeros que tienen Nap-dC/dT; tres aptámeros que tienen dC/Nap-dU; tres aptámeros que tienen dC/Pp-dU y dos aptámeros que tienen dC/Ty-dU) y veintidós aptámeros que tienen doble base modificada (es decir, tres aptámeros que tienen Nap-dC/Nap-dU; tres aptámeros que tienen Nap-dC/Pp-dU; tres aptámeros que tienen Nap-dC/Moe-dU; tres aptámeros que tienen Nap-dC/Tyr-dU; tres aptámeros que tienen Pp-dC/Pp-dU; tres aptámeros que tienen Pp-dC/Nap-dU; tres aptámeros que tienen Pp-Ty-dU, y un aptámero que tiene Pp-dC/Moe-dU). Los aptámeros debajo de la línea discontinua con una afinidad de 100 nM indica que no hay unión detectable a una concentración de 100 nM. Las afinidades con las PCs restantes PCSK5, PCSK6 y PCSK8) no se analizaron.

30 **Fig. 6.** Reactividad cruzada de especies de aptámeros con una única base modificada y con dos bases modificadas. Afinidad de aptámeros de 30 mer truncados con única modificación (tres aptámeros) y con dos modificaciones (38 aptámeros) (valor  $K_d \leq 1$  nM) a PCSK9 de humano, mono, ratón y rata. Los aptámeros con única modificación se unieron a PSCKS9 de humano y de mono, pero no a PSKC9 de ratón o rata. Por el contrario, los aptámeros con dos modificaciones se unieron a humano, mono, ratón y rata. El porcentaje de identidad de la proteína PCSK9 de cada especie se proporciona con respecto a la PSCK9 de humano.

35 **Fig. 7A-C.** Cribado de par tipo sándwich en un ensayo de Luminex® a base de perlas. **(A)** Diagrama esquemático del cribado de par tipo sándwich de aptámero. **(B)** Los pares tipo sándwich muestran una señal superior o igual a 50 veces a una concentración de PCSK9 10 nM en comparación con ausencia de proteína en el tampón. Todos los aptámeros analizados en el ensayo tipo sándwich eran de 40 mers teniendo un  $K_d \leq 1$  nM. Un total de 70 pares mostraron señales de  $\geq 50$  veces. Se identificaron tres pares tipo sándwich cuando cada aptámero del par se seleccionó de bibliotecas con única modificación (3 pares de aptámeros tipo sándwich/3 bibliotecas con única base modificada). Por el contrario, se identificaron 22 pares tipo sándwich cuando se seleccionó un aptámero del par de tres bibliotecas con única base modificada y el otro aptámero del par se seleccionó de cuatro bibliotecas con doble base modificada (es decir, 22 pares tipo sándwich de aptámero/3 bibliotecas con única base modificada, 4 bibliotecas con doble base modificada), y se identificaron 45 pares tipo sándwich cuando ambos aptámeros de los pares se seleccionaron de bibliotecas con modificación doble (45 pares tipo sándwich de aptámero/5 bibliotecas con doble base modificada). **(C)** Comparación del número de pares tipo sándwich para la proteína diana PCSK9 derivada de la biblioteca de aptámero de captura que tiene un aptámero con una única base modificada y la biblioteca de aptámero de detección que tiene un aptámero con única base modificada; la biblioteca de aptámero de captura tiene un aptámero con única base modificada y la biblioteca de aptámero de detección tiene un aptámero con dos bases modificadas; y la biblioteca de aptámero de captura tiene un aptámero con dos bases modificadas y la biblioteca de aptámero de detección tiene un aptámero con dos bases modificadas.

40 **Fig. 8A-D.** Pares tipo sándwich que muestran señales dependientes de la concentración de PCSK9 en ensayos de Luminex® a base de perlas. **(A)** Las señales dependientes de la concentración se observaron con un aptámero de captura o primario de mejor rendimiento emparejado con aptámeros secundarios o de detección selectos. **(B)** Las señales dependientes de la concentración se observaron con un aptámero secundario o de detección de mejor rendimiento emparejado con aptámeros primarios o de captura selectos. **(C)** Par tipo sándwich principal, aptámero

dC/PP-dU (primario) y aptámero Nap-dC/Nap-dU (secundario), que muestra señales cuando se cambia la orientación de los aptámeros. **(D)** Curva estándar obtenida con PCSK9 de tipo salvaje recombinante y mutante de ganancia de función PCSK9 D374Y. Las señales dependientes de la concentración lineales se obtuvieron con un par tipo sándwich que detecta PCSK9 de tipo salvaje (círculos) y la proteína mutante de ganancia de función PCSK9 D374Y (triángulos).

**Fig. 9A-B.** Sensibilidad del ensayo tipo sándwich: rendimiento del ensayo tipo sándwich de aptámero (aptámero dC/PP-dU (primario) y aptámero Nap-dC/Nap-dU (secundario)) que muestra los límites de detección de las concentraciones de PCSK9 en tampón. **(A)** Las señales dependientes de la concentración lineales se observaron con un ensayo tipo sándwich de aptámero con un límite inferior de cuantificación ~80 pg/ml (LLOQ) **(B)** Las señales dependientes de la concentración lineales se observaron con un ensayo tipo sándwich con un límite superior de cuantificación ~10 ng/ml (ULOQ).

**Fig. 10.** Linealidad de dilución del ensayo tipo sándwich usando un aptámero dC/PP-dU (primario) y un aptámero Nap-dC/Nap-dU (secundario).

**Fig. 11.** El ensayo tipo sándwich que comprende un aptámero con única base modificada primario y un aptámero con dos bases modificadas secundario (aptámero dC/PP-dU (primario) y aptámero Nap-dC/Nap-dU (secundario)).

**Fig. 12.** Sobreexpresión de PCSK9 en células HepG2 de tipo salvaje.

**Fig. 13.** Ensayos de inhibición de PCSK9 *in vitro* a base de placas: diagrama esquemático de la inhibición de PCSK9 con aptámeros.

**Fig. 14.** Prueba de la inhibición para aptámeros con única base modificada o dos bases modificadas.

**Fig. 15A-B.** Aptámeros con dos bases modificadas terapéuticos posibles de reactividad cruzada de especies. **(A)** Las afinidades del aptámero de reactividad cruzada de roedor con dos bases modificadas de 30 mer (PP-dC/Nap-dU) (11733-44, SEQ ID NO: 44) a PCSK9 de humano (círculo azul relleno), mutante de ganancia de función de humano PCSK9 D374Y (círculo rojo relleno), PCSK9 de mono Rhesus (cuadrado verde relleno), PCSK9 de rata (hexágono rosa relleno), PCSK9 de ratón (triángulo invertido relleno) y aptámero de control aleatorio (diamante negro abierto). **(B)** Aptámero con dos bases modificadas terapéutico posible de reactividad cruzada de especies que muestra inhibición de la interacción de PCSK9 con LDL-R. Aptámero que inhibe intensamente la interacción de PCSK9 con LDL-R a un valor de  $CE_{50}$  de 2,1 nM (círculo azul relleno) y PCSK9 D374Y a un valor de  $CE_{50}$  de 3,6 nM (triángulo rojo relleno) y el aptámero de control aleatorio que no muestra inhibición de PCSK9 de tipo salvaje (cuadrados verdes rellenos) y mutante de ganancia de función PCSK9 D374Y (cuadrados negros abiertos).

**Fig. 16.** Diagrama esquemático del ensayo de inversión de captación de LDL.

**Fig. 17.** El aptámero PP-dC/Nap-DU con reactividad cruzada de especies inhibió la degradación de LDL-R mediante el bloqueo de la interacción de PCSK9 con LDL-R y aumenta los niveles de LDL-R en la superficie de las células HepG2. El valor de  $CE_{50}$  para la inversión de captación de LDL es de 13,5 nM por SOMAmer activo (círculo rojo) que no se observó con el control aleatorio de la misma secuencia (triángulo azul).

**Fig. 18.** Estabilidad de aptámeros con única modificación y doble modificación en suero humano al 90 % con el tiempo. El patrón de modificación de aptámeros con única modificación en C-5 o doble modificación en C-5 se proporciona en la leyenda de la figura (por ejemplo, X/Y, donde X representa un dC (nucleótido no modificado), NapdC (Nap), o PPdC (PP); e Y representa un dU o dT (nucleótido no modificado, Tyr dU (Tyr), Nap dU (Nap), PP dU (PP) o MOE dU (MOE)).

**Fig. 19A-C.** Afinidades de unión de aptámeros de 40 mer (30N+5+5) a ErbB2 (A), ErbB3 (B), y PSMA (C) generadas usando varias bibliotecas modificadas. Los aptámeros con afinidades  $\geq 1$  nM están resaltados en un tono gris y los aptámeros mostrados con una afinidad de 320 nM representan que no hay una unión detectable en una concentración máxima de 32 nM en la curva de unión. La línea negra en cada una de la biblioteca indica el valor de la mediana para todos los aptámeros en esa biblioteca.

**Fig. 20.** Determinadas uridinas y citidinas modificadas en la posición 5 ilustrativas que pueden ser incorporadas en aptámeros.

**Fig. 21.** Determinadas modificaciones ilustrativas que pueden estar presentes en la posición 5 de uridina. La estructura química de la modificación en C-5 incluye el enlace amida ilustrativo que une la modificación a la posición 5 de la uridina. Los restos en la posición 5 mostrados incluyen un resto bencilo (por ejemplo, Bn, PE y un PP), un resto naftilo (por ejemplo, Nap, 2Nap, NE), un resto butilo (por ejemplo, iBu), un resto fluorobencilo (por ejemplo, FBn), un resto tirosilo (por ejemplo, un Tyr), un 3,4-metilendioxi bencilo (por ejemplo, MBn), un resto morfolino (por ejemplo, MOE), un resto benzofuranilo (por ejemplo, BF), un resto indol (por ejemplo, Trp) y un resto hidroxipropilo (por ejemplo, Thr).

**Fig. 22.** Determinadas modificaciones ilustrativas que pueden estar presentes en la posición 5 de citidina. La estructura química de la modificación en C-5 incluye el enlace amida ilustrativo que une la modificación a la posición 5 de la citidina. Los restos en la posición 5 mostrados incluyen un resto bencilo (por ejemplo, Bn, PE y un PP), un resto naftilo (por ejemplo, Nap, 2Nap, NE y 2NE) y un resto tirosilo (por ejemplo, un Tyr).

## 60 Descripción detallada

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con su uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes sobre biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

A menos que se explique de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. Los términos en singular "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. "Que comprende A o B" significa que incluye a A, o a B, o a A y a B. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción.

- 10 Además, se entiende que los intervalos proporcionados en el presente documento son una abreviatura de todos los valores comprendidos en el intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de número o subintervalo del grupo que consiste en 1, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 (así como fracciones de los mismos a menos que el contexto indique claramente lo contrario). Cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de número entero se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique lo contrario. Asimismo, cualquier intervalo numérico citado en el presente documento que se refiere a cualquier característica física, tal como subunidades de polímeros, tamaño o espesores, debe entenderse que incluyen cualquier número entero comprendido en el intervalo enumerado, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" o "que consiste esencialmente en" significa  $\pm 20\%$  del intervalo, valor o estructura indicado, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en el presente documento, los términos "incluye" y "comprende" son abiertos y se usan como sinónimos.
- 25 Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayos de la presente divulgación, se describen a continuación métodos y materiales adecuados.

Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

- 30 Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido o una forma modificada del mismo, así como un análogo del mismo. Los nucleótidos incluyen especies que incluyen purinas (por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina y sus derivados y análogos) así como pirimidinas (por ejemplo, citosina, uracilo, timina y sus derivados y análogos). Como se usa en el presente documento, el término "citidina" se usa de manera genérica para referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o un ribonucleótido modificado que comprende una base de citosina, a menos que se indique específicamente lo contrario.
- 35 El término "citidina" incluye citidinas modificadas en 2', tal como 2'-fluoro, 2'-metoxi, etc. De manera similar, la expresión "citidina modificada" o una citidina modificada específica también se refiere a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o un ribonucleótido modificado (tal como 2'-fluoro, 2'-metoxi, etc.) que comprende la base de citosina modificada, a menos que se indique específicamente lo contrario. El término "uridina" se usa de manera genérica para referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o un ribonucleótido modificado que comprende una base de uracilo, a menos que se indique específicamente lo contrario. El término "uridina" incluye uridinas modificadas en 2', tal como 2'-fluoro, 2'-metoxi, etc. De manera similar, la expresión "uridina modificada" o una uridina modificada específica también se refiere a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o un ribonucleótido modificado (tal como 2'-fluoro, 2'-metoxi, etc.) que comprende la base de uracilo modificada, a menos que se indique específicamente lo contrario.
- 45

Como se usa en el presente documento, la expresión "citidina modificada en la posición 5" o "citidina modificada en C-5" se refiere a una citidina con una modificación en la posición C-5 de la citidina, p. ej., como se muestra en la Figura 20. Las citidinas modificadas en la posición 5 ilustrativas no limitantes incluyen aquellas mostradas en la Figura 22.

50 Las citidinas modificadas en la posición 5 ilustrativas no limitantes incluyen, aunque sin limitación, 5-(N-bencilcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como "BndC" y mostrada en la Figura 21); 5-(N-2-feniletílcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como "PEdC" y mostrada en la Figura 21); 5-(N-3-fenilpropilcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como "PPdC" y mostrada en la Figura 21); 5-(N-1-naftilmetilcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como "NapdC" y mostrada en la Figura 21); 5-(N-2-naftilmetilcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como "2NapdC" y mostrada en la Figura 21); 5-(N-1-naftil-2-etilcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como "NEdC" y mostrada en la Figura 21); 5-(N-2-naftil-2-etilcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como "2NEdC" y mostrada en la Figura 21); y 5-(N-tirosilcarboxamida)-2'-desoxicitidina (denominada como TyrdC y mostrada en la Figura 21). En algunos aspectos de la divulgación, las citidinas modificadas en C5, p. ej., en su forma trifosfato, son capaces de ser incorporadas en un oligonucleótido por una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa KOD).

60

Las modificaciones químicas de las citidinas modificadas en C-5 descritas en el presente documento pueden también combinarse, individualmente o en cualquier combinación, con modificaciones de azúcar en la posición 2' por ejemplo, 2'-O-metilo o 2'-fluoro), modificaciones en aminas exocíclicas y sustitución de 4-tiocitidina y similares.

- 65 Como se usa en el presente documento, la expresión "uridina modificada en C-5" o "uridina modificada en la posición

5" se refiere a una uridina (normalmente una desoxiuridina) con una modificación en la posición C-5 de la uridina, p. ej., como se muestra en la Figura 20. En algunos aspectos de la divulgación, las uridinas modificadas en C5, p. ej., en su forma trifosfato, son capaces de ser incorporadas en un oligonucleótido por una polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa KOD). Las uridinas modificadas en la posición 5 ilustrativas no limitantes incluyen aquellas mostradas en la Figura 21. Las uridinas modificadas en la posición 5 ilustrativas no limitantes incluyen:

- 5-(N-bencilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (BndU),
- 5-(N-fenilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (PEdU),
- 5-(N-tiofenilmetilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (THdU),
- 10 5-(N-isobutilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (iBudU),
- 5-(N-tirosilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (TyrdU),
- 5-(N-3,4-metilendioxbencilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (MBndU),
- 5-(N-4-fluorobencilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (FBndU),
- 5-(N-3-fenilpropilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (PPdU),
- 15 5-(N-imidizoliletilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (ImdU),
- 5-(N-triptaminocarboxamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU),
- 5-(N-R-treoninilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (ThrdU),
- cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxamida)-2'-desoxiuridina,
- 5-(N-naftilmetilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (NapdU),
- 20 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxamida)-2'-desoxiuridina),
- 5-(N-2-naftilmetilcarboxamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU),
- 5-(N-1-naftiletalcarboxamida)-2'-desoxiuridina (NEdU),
- 5-(N-2-naftiletalcarboxamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU),
- 25 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxamida)-2'-desoxiuridina (BFdU),
- 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxamida)-2'-desoxiuridina (BTdU).

Las modificaciones químicas de las uridinas modificadas en C-5 descritas en el presente documento también pueden combinarse, individualmente o en cualquier combinación, con modificaciones de azúcar en la posición 2' por ejemplo, 2'-O-metilo o 2'-fluoro), modificaciones en aminas exocíclicas y sustitución de 4-tiouridina y similares.

30 Como se usa en el presente documento, los términos "modificar", "modificado", "modificación", y cualquier variación de los mismos, cuando se usan en referencia a un oligonucleótido, significan que al menos una de las cuatro bases nucleotídicas constituyentes (es decir, A, G, T/U y C) del oligonucleótido es un análogo o éster de un nucleótido de origen natural. En algunos aspectos de la divulgación, el nucleótido modificado confiere al oligonucleótido resistencia a la nucleasa. Las modificaciones adicionales pueden incluir modificaciones de la cadena principal, metilaciones, combinaciones de emparejamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como la protección. Otras modificaciones pueden incluir la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, las que tienen enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y aquellas con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), las que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquilantes y aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos, etc.). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en el azúcar de un nucleótido puede reemplazarse por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse mediante grupos de protección convencionales; o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o a un soporte sólido. Los grupos OH terminales 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas, restos de grupos de protección orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímeros de polietilenglicol (PEG) en un aspecto de la divulgación que varían de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 kDa, polímeros de PEG en otro aspecto de la divulgación que varían de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 kDa, u otros polímeros hidrófilos o hidrófobos biológicos o sintéticos.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se usan indistintamente para referirse a un polímero de nucleótidos e incluyen ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y modificaciones de estos tipos de ácidos nucleicos, oligonucleótidos y polinucleótidos, en donde se incluye la unión de varias entidades o restos a las unidades nucleotídicas en cualquier posición. Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", y "ácido nucleico" incluyen moléculas monocatenarias o bicatenarias, así como moléculas de triple hélice. Ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido son términos más amplios que el término aptámero y, por tanto, los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido incluyen polímeros de nucleótidos que son aptámeros, pero los términos ácido nucleico, oligonucleótido y polinucleótido no se limitan a aptámeros.

Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son normalmente conocidos en la técnica, incluyendo 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2'-fluoro, 2'-NH<sub>2</sub> o 2'-azido, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anómicos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos de nucleósidos acíclicos y análogos abásicos, tales como metil ribósido. Como se observa en el presente documento,

uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen aspectos de la divulgación en donde el fosfato se reemplaza con P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditiato"), (O)NR<sup>x</sup><sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R<sup>x</sup>, P(O)OR<sup>x</sup>, CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en el que cada R<sup>x</sup> o R<sup>x</sup> son independientemente H o alquilo(C1-C20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa en el diseño de un producto final, al igual que las estructuras de cadena principal alternativas como una cadena principal de poliamida, por ejemplo.

Los polinucleótidos pueden contener también formas análogas de análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos de nucleósidos acíclicos y análogos abásicos, tales como metil ribósido.

Si está presente, se puede realizar una modificación en la estructura nucleotídica antes o después del ensamblaje de un polímero. Se puede interrumpir una secuencia de nucleótidos mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje.

Como se usa en el presente documento, la expresión "al menos un nucleótido" cuando se refiere a modificaciones de un ácido nucleico, se refiere a uno, varios o todos los nucleótidos del ácido nucleico, indicando que cualquiera o todas las ocurrencias de cualquiera o todos de A, C, T, G o U en un ácido nucleico pueden estar modificadas o no.

Como se usa en el presente documento, "ligando de ácido nucleico", "aptámero", "SOMAmer", y "clon" se usan indistintamente para referirse a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una molécula diana. Una acción deseable incluye, pero no se limita a, unirse a la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de una forma que modifica o altera la diana o la actividad funcional de la diana, unirse covalentemente a la diana (como en un inhibidor suicida) y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En un aspecto de la divulgación, la acción es afinidad de unión específica por una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional diferente a un polinucleótido que se une al aptámero a través de un mecanismo que es independiente de la formación de pares de bases de Watson/Crick o la formación de hélices triples, en donde el aptámero no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de unirse a la molécula diana. Los aptámeros para una diana dada incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos, donde el aptámero es un ligando de la diana, mediante un método que comprende: (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana con respecto a otros ácidos nucleicos en la mezcla candidata se pueden separar del resto de la mezcla candidata; (b) separar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada de los restos de la mezcla candidata; y (c) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, con lo que se identifican los aptámeros de la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son una cuestión de grado; sin embargo, en este contexto, la "afinidad de unión específica" de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana normalmente con un grado mucho más alto de afinidad que si se une a otros componentes, no diana, en una mezcla o muestra. Un "aptámero", "SOMAmer", o "ligando de ácido nucleico" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. "Aptámeros" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN y pueden ser de cadena simple, de cadena doble o contener regiones de cadena doble o cadena triple. En algunos aspectos de la divulgación, los aptámeros se preparan usando un proceso SELEX como se ha descrito en el presente documento, o se conoce en la técnica.

Como se usa en el presente documento, un "SOMAmer" o aptámero modificado con tasa de disociación lenta se refiere a un aptámero que tiene características de tasa de disociación mejoradas. Los SOMAmer pueden ser generados usando los métodos SELEX mejorados descritos en la patente de Estados Unidos N.º 7.947.447, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates".

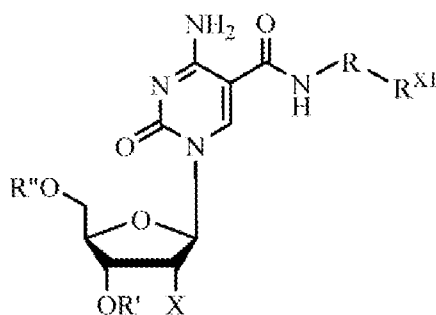
Como se usa en el presente documento, un aptámero que comprende dos tipos diferentes de pirimidinas modificadas en la posición 5 o pirimidinas modificadas en C-5 puede denominarse "aptámeros con doble modificación", aptámeros que tienen "dos bases modificadas", aptámeros que tienen "modificaciones de dos bases" o "dos bases modificadas", aptámero que tiene "bases dobles modificadas", todos los cuales pueden usarse indistintamente. Una biblioteca de aptámeros o biblioteca de aptámero también puede usar la misma terminología. Por tanto, en algunos aspectos de la divulgación, un aptámero comprende dos pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes, en donde las dos pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes se seleccionan de una NapdC y una NapdU, una NapdC y una PPdU, una NapdC y una MOEdU, una NapdC y una TyrdU, una NapdC y una Thrdu, una PPdC y una PPdU, una PPdC y una NapdU, una PPdC y una MOEdU, una PPdC y una TyrdU, una PPdC y una Thrdu, una NapdC y una 2NapdU, una NapdC y una TrpdU, una 2NapdC y una NapdU, y 2NapdC y una 2NapdU, una 2NapdC y una PPdU, una 2NapdC y una TrpdU, una 2NapdC y una TyrdU, una PPdC y una 2NapdU, una PPdC y una TrpdU, una PPdC y una TyrdU, una TyrdC y una TyrdU, una TrydC y una 2NapdU, una TyrdC y una PPdU, una TyrdC y una TrpdU, una TyrdC y una TyrdU, y una TyrdC y una TyrdU. En algunos aspectos de la divulgación, un aptámero comprende al menos una uridina y/o timidina modificada y al menos una citidina modificada, en donde la al menos una uridina y/o

- 5 timidina modificada se modifica en la posición 5 con un resto seleccionado de un resto naftilo, un resto bencilo, un resto fluorobencilo, un resto tirosilo, un resto indol, un resto morfolino, un resto isobutilo, un resto 3,4-metilendioxbencilo, un resto benzotiofenilo y un resto benzofuranilo, y en donde la al menos un citidina modificada se modifica en la posición 5 con un resto seleccionado de un resto naftilo, un resto tirosilo y un resto bencilo. En determinados aspectos de la divulgación, el resto está enlazado de manera covalente en la posición 5 de la base mediante un enlazador que comprende un grupo seleccionado de un enlazador de amida, un enlazador de carbonilo, un enlazador de propinilo, un enlazador de alquino, un enlazador de éster, un enlazador de urea, un enlazador de carbamato, un enlazador de guanidina, un enlazador de amidina, un enlazador de sulfóxido y un enlazador de sulfona.
- 10 Como se usa en el presente documento, un aptámero que comprende un único tipo de pirimidina modificada en la posición 5 o pirimidina modificada en C-5 puede denominarse "aptámeros con única modificación", aptámeros que tienen una "única base modificada", aptámeros que tienen una "modificación de base única" o "bases únicas modificadas", todos los cuales pueden usarse indistintamente. Una biblioteca de aptámeros o biblioteca de aptámero también puede usar la misma terminología. Como se usa en el presente documento, "proteína" se usa como sinónimo de "péptido", "polipéptido", o "fragmento peptídico". Un polipéptido, proteína, péptido o fragmento peptídico "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula, tejido, fuente libre de células a partir de la cual se ha obtenido la secuencia de aminoácidos, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente.
- 15 En determinados aspectos de la divulgación, un aptámero comprende una primera pirimidina modificada en la posición 5 y una segunda pirimidina modificada en la posición 5, en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 comprende un resto tirosilo en la posición 5 de la primera pirimidina modificada en la posición 5, y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 comprende un resto naftilo o resto bencilo en la posición 5 en la segunda pirimidina modificada en la posición 5. En aspectos relacionados de la divulgación, la primera pirimidina modificada en la posición 5 es un uracilo. En un aspecto relacionado, la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citosina. En un aspecto relacionado de la divulgación, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los uracilos del aptámero están modificados en la posición 5. En aspectos relacionados de la divulgación, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de la citosina del aptámero está modificada en la posición 5.
- 20
- 25
- 30

### Nucleótidos modificados

- 35 La divulgación proporciona oligonucleótidos, tales como aptámeros, que comprenden dos tipos diferentes de nucleótidos modificados en la base. Los oligonucleótidos comprenden dos tipos diferentes de pirimidinas modificadas en la posición 5. El oligonucleótido comprende al menos una citidina modificada en C5 y al menos una uridina modificada en C5. En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende dos citidinas modificadas en C5 diferentes. En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende dos uridinas modificadas en C5 diferentes. Las uridinas y citidinas modificadas en C5 ilustrativas no limitantes se muestran, por ejemplo, en la Fórmula I a continuación y en la Figura 20. Determinadas uridinas modificadas en C5 ilustrativas se muestran en la Figura 21, y determinadas citidinas modificadas en C5 ilustrativas se muestran en la Figura 22.
- 40

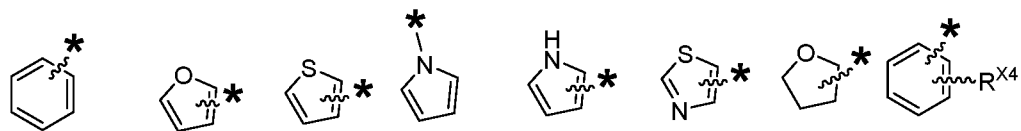
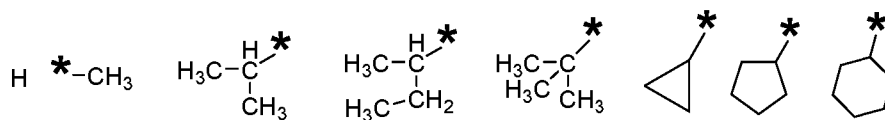
En algunos aspectos de la divulgación, el oligonucleótido comprende al menos una pirimidina de Fórmula I:



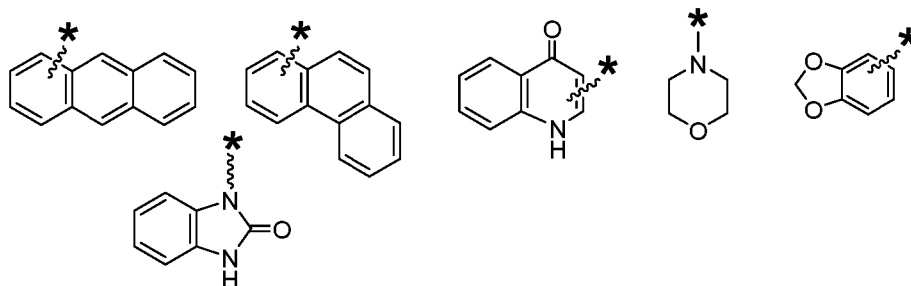
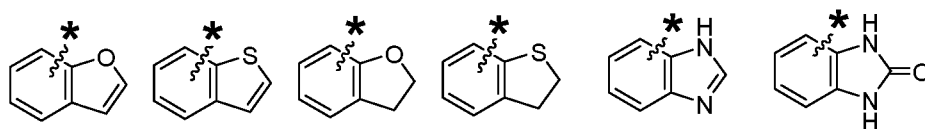
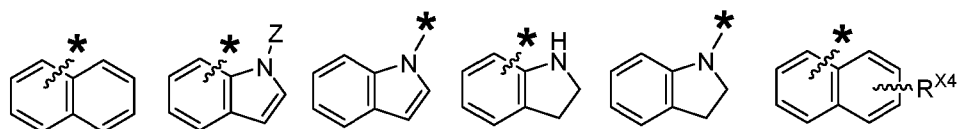
Fórmula I

en donde

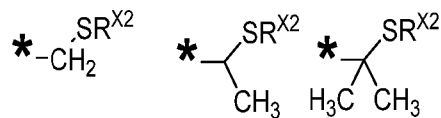
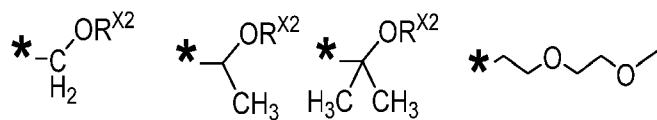
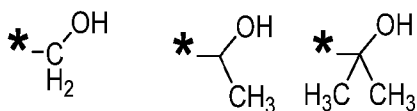
- 50 R es independientemente un  $-(CH_2)_n-$ , en donde n es un número entero seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;  
 $R^{XI}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en



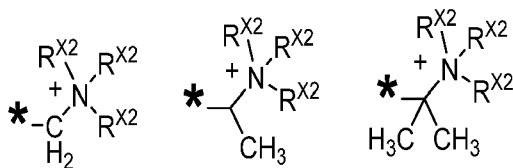
5

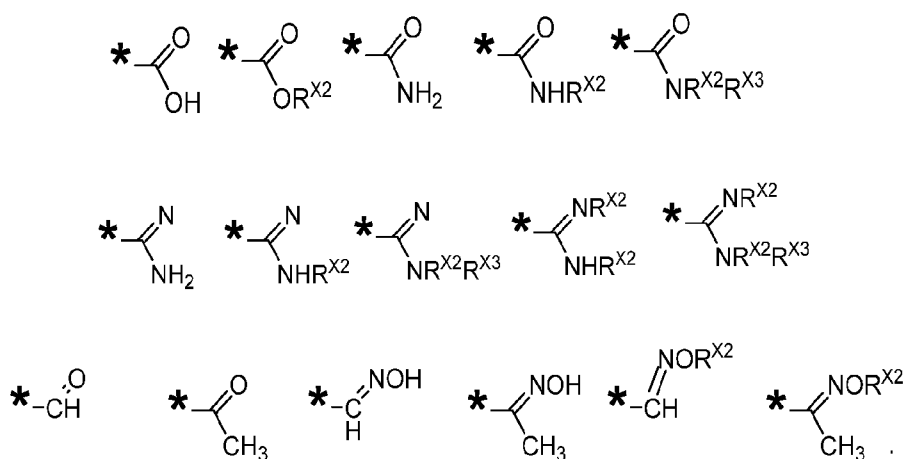


10



15





5

en donde, \* denota el punto de unión del grupo  $\text{R}^{\text{X}1}$  al grupo  $-(\text{CH}_2)_n-$ ; y en donde,

10  $\text{R}^{\text{X}4}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; un grupo hidroxilo; un halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico ( $\text{BO}_2\text{H}_2$ ); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico ( $\text{COOR}^{\text{X}2}$ ); amida primaria ( $\text{CONH}_2$ ); amida secundaria ( $\text{CONHR}^{\text{X}2}$ ); amida terciaria ( $\text{CONR}^{\text{X}2}\text{R}^{\text{X}3}$ ); sulfonamida ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ); N-alquilsulfonamida ( $\text{SONHR}^{\text{X}2}$ );

15  $\text{R}^{\text{X}2}$  y  $\text{R}^{\text{X}3}$  se seleccionan independientemente, por cada aparición, del grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; fenilo ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ); un anillo de fenilo sustituido con  $\text{R}^{\text{X}4}$  ( $\text{R}^{\text{X}4}\text{C}_6\text{H}_4$ ), en donde  $\text{R}^{\text{X}4}$  se define anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico ( $\text{COOR}^{\text{X}5}$ ), en donde  $\text{R}^{\text{X}5}$  es un alquilo inferior (C1-C20) ramificado o lineal; y cicloalquilo, en donde  $\text{R}^{\text{X}2}$  y  $\text{R}^{\text{X}3}$  juntos forman un anillo de 5 o 6 miembros sustituido o no sustituido;

X se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> y -azido;

20  $\text{R}^1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en un -H, -OAc, -OBz; -P(NiPr<sub>2</sub>)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); y -OSiMe<sub>2</sub>tBu;

$\text{R}^n$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en un hidrógeno, 4,4'-dimetoxitritilo (DMT) y trifosfato (-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)<sub>2</sub>) o una sal de los mismos;

25 Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en un -H, alquilo C(1-4) sustituido o no sustituido;

y sales de los mismos.

30 En algunos aspecto de la divulgación, el oligonucleótido comprende al menos una pirimidina modificada mostrada en la Figura 21, en donde cada X se selecciona independientemente de -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> y -azido.

35 En algunos aspecto de la divulgación, el oligonucleótido comprende al menos una pirimidina modificada mostrada en la Figura 22, en donde cada X se selecciona independientemente de -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> y -azido.

40 En algunos aspectos de la divulgación, el oligonucleótido comprende al menos una pirimidina modificada mostrada en la Figura 21 y al menos una pirimidina modificada mostrada en la Figura 22, en donde cada X se selecciona independientemente de -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> y -azido. Determinados pares ilustrativos no limitantes de pirimidinas modificadas se muestran en los Ejemplos descritos en el presente documento.

45 En algunos aspecto de la divulgación, el oligonucleótido comprende al menos una pirimidina modificada mostrada en la Figura 20, en donde la posición 2' de la ribosa se selecciona independientemente de -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> y -azido. En algunos aspectos de la divulgación, el oligonucleótido comprende al menos dos pirimidinas modificadas mostradas en la Figura 20, en donde la posición 2' de la ribosa se selecciona independientemente de -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> y -azido.

50 En algunos aspectos de la divulgación, el oligonucleótido comprende al menos una pirimidina modificada mostrada en la Figura 20 y al menos una pirimidina modificada mostrada en la Figura 21 o en la Figura 22, en donde la posición 2' de la ribosa se selecciona independientemente de -H, -OH, -OMe, -O-alilo, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> y -azido. Determinados pares ilustrativos no limitantes de pirimidinas modificadas se muestran en los Ejemplos descritos en el presente documento.

En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido puede ser un aptámero. En algunas de dichas realizaciones, el oligonucleótido es un aptámero que se une específicamente a un polipéptido diana.

## Preparación de oligonucleótidos

La síntesis automatizada de oligodesoxinucleósidos es una práctica habitual en muchos laboratorios (véase, por ejemplo, Matteucci, M. D. y Caruthers, M. H., (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185-3191). También es bien conocida la síntesis de oligorribonucleósidos (véase, por ejemplo Scaringe, S. A., *et al.*, (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:5433-5441). Como se observa en el presente documento, las fosforamiditas son útiles para incorporar el nucleósido modificado a un oligonucleótido mediante síntesis química y los trifosfatos son útiles para incorporar el nucleósido modificado a un oligonucleótido mediante síntesis enzimática. (Véase, p. ej., Vaught, J. D. *et al.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, 126:11231-11237; Vaught, J. V., *et al.* (2010) *J. Am. Chem. Soc.* 132, 4.141-4151; Gait, M. J. "Oligonucleotide Synthesis a practical approach" (1984) IRL Press (Oxford, Reino Unido); Herdewijn, P. "Oligonucleotide Synthesis" (2005) (Humana Press, Totowa, N.J.).

## El método SELEX

Los términos "SELEX" y "proceso SELEX" se usan indistintamente en el presente documento para referirse, normalmente, a una combinación de (1) la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una molécula diana de una forma deseable, por ejemplo, unión con alta afinidad a una proteína, con (2) la amplificación de esos ácidos nucleicos seleccionados. El proceso SELEX se puede usar para identificar aptámeros con alta afinidad por una molécula diana específica o biomarcador.

Normalmente, SELEX incluye preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, unir la mezcla candidata a la molécula diana deseada para formar un complejo de afinidad, separar los complejos de afinidad de los ácidos nucleicos candidatos no unidos, separar y aislar el ácido nucleico del complejo de afinidad, purificar el ácido nucleico e identificar una secuencia de aptámero específica. El proceso puede incluir múltiples ciclos para perfeccionar adicionalmente la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir fases de amplificación en uno o más puntos en el proceso. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos N.º 5.475.096, titulada "Nucleic Acid Ligands". El proceso SELEX se puede usar para generar un aptámero que se une covalentemente a su diana así como un aptámero que se une no covalentemente a su diana. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos N.º 5.705.337 titulada "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX".

El proceso SELEX se puede usar para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas en el aptámero, tal como, por ejemplo, características de administración mejoradas o estabilidad *in vivo* mejorada. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de base y/o ribosa y/o fosfato. Se describen aptámeros identificados con el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados en la patente de Estados Unidos N.º 5.660.985, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. la patente de Estados Unidos N.º 5.580.737, véase más arriba, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20090098549, titulada "SELEX" y "PHOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades químicas y físicas expandidas y su uso en SELEX y photoSELEX.

También puede usarse SELEX para identificar aptámeros que tienen características de tasa de disociación deseables. Véase, la patente de Estados Unidos N.º 7.947.447, titulada "Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates", que describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que pueden unirse a moléculas diana. Se describen métodos para producir aptámeros y fotoaptámeros que tienen tasas más lentas de disociación de sus respectivas moléculas diana. Los métodos implican poner en contacto la mezcla candidata con la molécula diana, permitir que ocurra la formación de complejos ácido nucleico-diana y realizar un proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta en donde los complejos ácido nucleico-diana con tasas de disociación rápidas se disocian y no se reforman, mientras que los complejos con tasa de disociación lenta permanecen intactos. De manera adicional, los métodos incluyen el uso de nucleótidos modificados en la producción de mezclas de ácido nucleico candidatas para generar aptámeros con rendimiento de tasa de disociación mejorado (véase, la patente de Estados Unidos N.º 8.409.795, titulada "SELEX and PhotoSELEX"). (Véanse también la patente de Estados Unidos N.º 7.855.054 y la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20070166740).

"Diana" o "molécula diana" o "diana" se refiere en el presente documento a cualquier compuesto sobre el cual un ácido nucleico puede actuar de una forma deseable. Una molécula diana puede ser una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido, polisacárido, glucoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, tinte, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier porción o fragmento de cualquiera de los anteriores, etc., sin limitación. Prácticamente cualquier efector químico o biológico puede ser una diana adecuada. Pueden servir como dianas moléculas de cualquier tamaño. También se puede modificar una diana de ciertas maneras para mejorar la probabilidad o resistencia de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana también puede incluir cualquier variación menor de una molécula o compuesto particular, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación,

acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado, que no altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular que es capaz de unirse a un aptámero. "Moléculas diana" o "dianas" se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Las realizaciones del proceso SELEX en las que la diana es un péptido se describen en la patente de Estados Unidos N.º 6.376.190, titulada "Modified SELEX Processes Without Purified Protein". En algunas realizaciones, una diana es una proteína.

Como se usa en el presente documento, "molécula competidora" y "competidor" se usan indistintamente para referirse a cualquier molécula que pueda formar un complejo no específico con una molécula no diana. En este contexto, las moléculas no diana incluyen aptámeros libres, donde, por ejemplo, un competidor puede usarse para inhibir la unión del aptámero (volver a unirse), no específicamente, a otra molécula no diana. Una "molécula competidora" o "competidor" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula. "Moléculas competidoras" o "competidores" hacen referencia a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Las moléculas competidoras incluyen, aunque sin limitación, oligonucleótidos, polianiones (por ejemplo, heparina, ADN de esperma de arenque, ADN de esperma de salmón, ARNt, sulfato de dextrano, polidextrano, polímeros fosfodiéster abásicos, dNTPs y pirofosfato). En varios aspectos de la divulgación, puede usarse una combinación de uno o más competidores.

Como se usa en el presente documento, "complejo no específico" se refiere a una asociación no covalente entre dos o más moléculas diferentes a un aptámero y su molécula diana. Un complejo no específico representa una interacción entre clases de moléculas. Los complejos no específicos incluyen complejos formados entre un aptámero y una molécula no diana, un competidor y una molécula no diana, un competidor y una molécula diana, y una molécula diana y una molécula no diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta" se refiere a un proceso para alterar las concentraciones relativas de determinados componentes de una mezcla candidata de modo que la concentración relativa de los complejos de afinidad de aptámero que tengan tasas de disociación lentas se incrementa en relación con la concentración de los complejos de afinidad de aptámero que tienen tasas de disociación más rápidas y menos deseables. En un aspecto de la divulgación, el proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta es un proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta a base de soluciones. En este proceso, un proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta a base de soluciones tiene lugar en solución, de manera que ni la diana ni los ácidos nucleicos que forman los complejos de afinidad de aptámero en la mezcla están inmovilizados en un soporte sólido durante el proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta. En varios aspectos, el proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta puede incluir una o más etapas, incluyendo la adición e incubación con una molécula competidora, dilución de la mezcla o una combinación de estas (por ejemplo, dilución de la mezcla en presencia de una molécula competidora). Debido a que el efecto del proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta depende en general de las diferentes tasas de disociación de complejos de afinidad de aptámero diferentes (es decir, complejos de afinidad de aptámero formados entre la molécula diana y ácidos nucleicos diferentes en la mezcla candidata), duración del proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta se selecciona para retener una alta proporción de los complejos de afinidad de aptámero que tengan tasas de disociación lentas mientras reduce sustancialmente el número de complejos de afinidad de aptámero que tengan tasas de disociación rápidas. El proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta puede usarse en uno o más ciclos durante el proceso SELEX. Cuando la dilución y la adición de un competidor se usan en combinación, pueden realizarse de forma simultánea o de forma secuencial, en cualquier orden. El proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta puede usarse cuando la concentración de diana (proteína) en la mezcla es baja. En un aspecto, cuando el proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta incluye dilución, la mezcla puede diluirse tanto como sea práctico, teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos retenidos por el aptámero se recuperan para ciclos posteriores en el proceso SELEX. En unos aspectos, el proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta incluye el uso de un competidor así como dilución, permitiendo que la mezcla sea diluida menos de lo que sería necesario sin el uso de un competidor.

En un aspecto de la divulgación, el proceso 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 usado en la identificación de aptámeros específicos en selecciones previas de SELEX. En dichos métodos, sin embargo, la heparina o el dextrano están presentes durante la etapa de equilibrio en la que la diana y el aptámero se unen para formar complejos. En dichos métodos, a medida que aumenta la concentración de heparina o dextrano, aumenta la relación de los complejos diana/aptámero de alta afinidad por 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 el equilibrio debido a la competencia por la unión a la diana entre el ácido nucleico y el competidor. En cambio, los métodos descritos actualmente añaden el competidor después de que se haya permitido formar los complejos diana/aptámeros y, por ello, no afecta el número de complejos formados. La adición del competidor después de que la unión en equilibrio se haya producido entre la diana y el aptámero crea un estado de no equilibrio que evoluciona en el tiempo a un nuevo equilibrio con menos complejos diana/aptámero. Atrapar los complejos diana/aptámero antes de que se haya alcanzado el nuevo equilibrio enriquece la muestra de aptámeros de tasa de disociación lenta puesto que los complejos de tasa de disociación rápida se disociarán primero.

En otros aspectos de la divulgación, un competidor polianiónico (por ejemplo, sulfato de dextrano u otro material

- polianiónico) se usa en el proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta para facilitar la identificación de un aptámero que es refractario en 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 y que también contenga el material refractario polianiónico que un complejo aptámero/diana que incluye un aptámero refractario no polianiónico. De esta manera, los aptámeros refractarios polianiónicos pueden usarse en la realización de métodos analíticos para detectar la presencia o cantidad o concentración de una diana en una muestra, donde el método de detección incluye el uso del material polianiónico (por ejemplo, sulfato de dextrano) al que el aptámero es refractario.
- 5 Por tanto, en un aspecto de la divulgación, se proporciona un método para producir un aptámero refractario polianiónico. En este aspecto, después de ponerse en contacto con una mezcla candidata de ácidos nucleicos con la diana. Se deja que la diana y los ácidos nucleico en la mezcla candidata lleguen a un equilibrio. Se introduce un competidor polianiónico y se deja incubar en la solución durante un periodo de tiempo suficiente para asegurar que la mayoría de los aptámeros de tasa de disociación rápida en la mezcla candidata se disocian de la molécula diana.
- 10 Asimismo, los aptámeros en la mezcla candidata que pueden disociarse en presencia del competidor polianiónico se liberarán de la molécula diana. La mezcla está separada para aislar los aptámeros de tasa de disociación lenta de alta afinidad que se mantuvieron en asociación con la molécula diana y para eliminar cualquier material que no haya formado complejos de la solución. El aptámero puede entonces liberarse de la molécula diana y aislarse. El aptámero aislado también puede amplificarse y aplicarse rondas adicionales de selección para aumentar el rendimiento general de los aptámeros seleccionados. Este proceso también puede usarse con un tiempo de incubación mínimo si la selección de los aptámeros de tasa de disociación lenta no es necesaria para una aplicación específica.
- 15 Por tanto, en unos aspectos de la divulgación, se proporciona un proceso SELEX modificado para la identificación o la producción de aptámeros que tienen tasas de disociación lentas (largas) en donde la molécula diana y la mezcla candidata se ponen en contacto y se incuban en conjunto durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca una unión en equilibrio entre la molécula diana y los ácidos nucleicos contenidos en la mezcla candidata. Tras la unión en equilibrio, se añade un exceso de molécula competidora, p. ej., competidor de polianión, a la mezcla y la mezcla se incuba junto con el exceso de molécula competidora durante un periodo de tiempo predeterminado. Una proporción significativa de aptámeros que tienen tasas de disociación que son inferiores a este periodo de incubación predeterminado se disociará de la diana durante el periodo de incubación predeterminado. La reasociación de estos aptámeros de tasa de disociación rápida con la diana se minimiza debido al exceso de la molécula competidora que no se puede unir específicamente a la diana y ocupar sitios de unión a la diana. Una proporción significativa de aptámeros que tienen tasas de disociación más largas permanecerán en complejos con la diana durante el periodo de incubación predeterminado. Al final del periodo de incubación, separar los complejos de ácido nucleico-diana del resto de la mezcla permite la separación de una población de aptámeros de tasa disociación lenta de aquellos que tienen tasas de disociación rápidas. Una etapa de disociación puede usarse para disociar los aptámeros de tasa de disociación lenta de su diana y permite el aislamiento, identificación, secuenciación, síntesis y amplificación de aptámeros de tasa de disociación lenta (aptámeros individuales o de un grupo de aptámeros de tasa de disociación lenta) que tienen una alta afinidad y especificidad por la molécula diana. Como en SELEX convencional, las secuencias de aptámero identificadas de una ronda del proceso SELEX modificado pueden usarse en la síntesis de una nueva mezcla candidata de manera que las etapas de puesta en contacto, unión en equilibrio, adición de una molécula competidora, incubación con molécula competidora y separación de aptámeros de tasa de disociación lenta pueden iterarse/repetirse cuantas veces se desee.
- 20 La combinación de permitir la unión en equilibrio de la mezcla candidata con la diana antes de la adición del competidor, seguido 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 más grandes que las obtenidas previamente.
- 25 Con el fin de alcanzar la unión en equilibrio, la mezcla candidata puede incubarse 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.
- 30 El periodo de incubación predeterminado de la molécula competidora con la mezcla de la mezcla candidata y la molécula diana puede seleccionarse según se desee, teniendo en cuenta los factores tales como la naturaleza de la diana y las tasas de disociación conocidas (si las hubiera) de aptámeros conocidos para la diana. Los periodos de incubación predeterminados pueden seleccionarse de: al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 6 horas.
- 35 En otros aspectos de la divulgación, se usa una dilución como un proceso de mejora de tasa de disociación e incubación de la mezcla candidata diluida, el complejo de molécula diana/aptámero puede llevarse a cabo durante un periodo de tiempo predeterminado, que puede seleccionarse de: al menos aproximadamente 5 minutos, al menos
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

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.

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

20 Un rasgo característico de un aptámero identificado por un procedimiento SELEX es su alta afinidad por su diana. Un aptámero tendrá una constante de disociación (kd) para su diana que se selecciona de uno de: menos de aproximadamente 1  $\mu$ M, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 100 pM, menos de aproximadamente 10 pM, menos de aproximadamente 1 pM.

## 25 Bibliotecas de oligonucleótidos

30 En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan bibliotecas de oligonucleótidos que comprenden secuencias aleatorias. Dichas bibliotecas pueden ser útiles, en algunas realizaciones, para realizar SELEX. En algunos aspectos de la divulgación, cada oligonucleótido de una biblioteca de oligonucleótidos comprende un número de posiciones seleccionadas al azar, tales como al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50, o 20-100, 20-80, 20-70, 20-60, 20-50, 20-40, o 30-40 posiciones seleccionadas al azar. En algunos aspectos de la divulgación, cada oligonucleótido de una biblioteca de oligonucleótidos comprende secuencias fijas que flanquean las posiciones seleccionadas al azar. Dichas secuencias flanqueantes fijas pueden ser las mismas o diferentes entre sí (es decir, la secuencia flanqueante 5' y la secuencia flanqueante 3' pueden ser las mismas o diferentes), y pueden, en algunos aspectos, pueden ser las mismas para todos los miembros de la biblioteca (es decir, todos los miembros de la biblioteca pueden tener la misma secuencia flanqueante 5' y/o todos los miembros de la biblioteca pueden tener la misma secuencia flanqueante 3').

40 En algunas realizaciones, las posiciones seleccionadas al azar pueden estar compuestas por cuatro o más bases nucleotídicas diferentes, una o más de las cuales está modificada. En algunas realizaciones, todas de un tipo de bases nucleotídicas está modificada o no modificada (por ejemplo, todas las citidinas de la región seleccionada al azar o modificadas, o todas están sin modificar). En algunas realizaciones, un tipo de base nucleotídica en la región seleccionada al azar está presente tanto en formas modificadas como no modificadas. En algunas de dichas realizaciones, las posiciones seleccionadas al azar están formadas por dos bases nucleotídicas modificadas y dos no modificadas. En algunas de dichas realizaciones, las posiciones seleccionadas al azar están formadas por adenina, guanina, citidina modificada en C5 y uridina modificada en C5. Las citidinas modificadas en C5 y las uridinas modificadas en C5 ilustrativas no limitantes se muestran en las Figuras 19 a 21. También se describe bibliotecas de oligonucleótidos y métodos para fabricarlas, p. ej., en los Ejemplos en el presente documento.

## 50 Aptámeros ilustrativos

55 En algunas realizaciones, se proporcionan aptámeros que se unen a una molécula diana. En algunas realizaciones, la molécula diana es una proteína diana. En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan aptámeros que se unen a PCSK9. En algunas realizaciones, un aptámero que se une a PCSK9 inhibe la unión de PCSK9 a LDL-R. En algunos de dichos aspectos de la divulgación, el aptámero comprende la secuencia 5'-yGpppG-3', en donde cada y es una TyrU y cada p es una NapdC. En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero comprende además la secuencia 5'-yEAYGA<sub>n</sub>pAp-3', en donde E se selecciona de y, A y G; y n es 0 o 1. En algunos aspectos de la divulgación, n es 0. En algunos aspectos de la divulgación, la secuencia 5'-yEAYGA<sub>n</sub>pAp-3' se ubica en 5' de la secuencia 5'-yGpppG-3'. En algunos aspectos de la divulgación, E es y.

60 En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un aptámero que se une a PCSK9, en donde el aptámero comprende la secuencia 5'-F<sub>n</sub>pppAAGRJrpRppW<sub>m</sub>-3' (SEQ ID NO: 81), en donde F se selecciona de r y G; cada R se selecciona independientemente de G y A; J se selecciona de r y A; W se selecciona de r, G y A; n es 0 o 1; m es 0 o 1; r es PpdC; y p es NapdU. En algunos aspectos de la divulgación, m es 1. En algunas realizaciones, F es r. En algunas realizaciones, J es r. En algunos aspectos de la divulgación, W es G.

65 En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un aptámero que se une a PCSK9, en donde el aptámero

comprende la secuencia 5'-TTppGGpp-3', en donde cada p es una NapdC.

En algunos aspectos de la divulgación, un aptámero que se une a PCSK9 tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 80, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 40 a 100, o 40 a 90, o 40 a 80, o 40 a 70, o 40 a 60, o 40 a 50 nucleótidos.

En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero inhibe la unión de PCSK9 a LDL-R. En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero inhibe la unión de PCSK9 a LDL-R con una  $CI_{50}$  inferior a 30 nM, inferior a 20 nM o inferior a 15 nM.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una composición para su uso en un método para reducir el colesterol en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un aptámero que se une a PCSK9. En algunos aspectos de la divulgación, el aptámero que se une a PCSK9 es un aptámero proporcionado en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, el colesterol es colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (LDL-C). En algunos aspectos de la divulgación, el sujeto tiene hipercolesterolemia familiar heterocigota o enfermedad cardiovascular aterosclerótica clínica (CVD).

### Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se analizan en Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutically Acceptable Salts" J. Pharm. Sci. 66:1-19.

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO<sup>-</sup>), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Algunos ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, iones de metales alcalinos tales como Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, cationes alcalinotérreos tales como Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y otros cationes tales como Al<sup>3+</sup>. Algunos ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, ion amonio (es decir, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH<sub>3</sub>R<sup>X+</sup>, NH<sub>2</sub>R<sup>X<sub>2</sub>+</sup>, NHR<sup>X<sub>3</sub>+</sup>, NR<sup>X<sub>4</sub>+</sup>). Algunos ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperizina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, -NH<sub>2</sub> puede ser -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Algunos ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

Algunos ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetioxi benzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etandisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalencarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, místico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Algunos ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, aunque sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular también incluye formas salinas de los mismos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Aptámeros que comprenden dos bases modificadas

Para comparar la eficacia relativa de SELEX con dos bases modificadas, cinco modificaciones únicas en dU (Nap-dU, PP-dU, MOE-dU, Tyr-dU y Thr-dU) con dT sin modificar como control, y combinaciones con modificaciones en dC (Nap-dC y PP-dC) con dC sin modificar como control, fueron analizadas, para un total de 18 bibliotecas de partida (**Fig. 1**). Los tipos de modificaciones analizadas incluyeron cadenas laterales aromáticas hidrófobas análogas a cadenas laterales hidrófobas en aminoácidos. También se analizaron cadenas laterales hidrófilas en dU (MOE-dU y Thr-dU). Cada una de las 18 bibliotecas contenía 30 nucleótidos seleccionados al azar, permitiendo  $\geq 10^{15}$  secuencias diferentes. Las bibliotecas se sintetizaron enzimáticamente usando trifosfatos nucleótidos naturales y/o modificados usando ADN polimerasa KOD, Exo- (datos no mostrados).

Se usaron bibliotecas seleccionadas al azar de treinta nucleótidos (30N) en lugar de las bibliotecas seleccionadas al azar de 40N anteriores con dUs con única modificación. Sin pretender quedar ligados a teoría particular alguna, se propuso que el aumento de la densidad de las bases modificadas permitiría obtener aptámeros de alta afinidad más

cortos. Además, las bibliotecas de oligonucleótidos más cortos dan mayores rendimientos. La relación de cada nucleótido fue 1:1:1:1 para dA/dC/dG/dT (25 % cada uno). En cada caso, la región aleatoria se flanqueó con secuencias fijas para hibridar cebadores de amplificación por PCR (**Tabla 2**), con espaciadores adicionales en el extremo 5' y en el extremo 3'. Se usó el molde sintético maestro para generar bibliotecas modificadas con todas las posiciones dU y o dC modificadas de manera uniforme en reacciones de extensión de cebadores de reemplazo.

Un total de 18 bibliotecas sintetizadas enzimáticamente comprenden dU con modificación única (Nap-dU, PP-dU, MOE-dU, Tyr-dU y /Thr-dU) con dT sin modificar como control; dC con modificación única (Nap-dC y PP-dC) con dC sin modificar como control; y combinación de dos bases modificadas: Nap-dC o PP-dC, con todos los dUs modificados posibles (Nap-dU, PP-dU, MOE-dU, Tyr-dU y Thr-dU). Las reacciones de extensión de cebadores cualitativas (en triplicados) se llevaron a cabo usando un molde antisentido, cebador 5' radiomarcado con trifosfatos nucleótidos naturales modificados y polimerasa de KOD (Exo-) en solución, de la siguiente manera. En una reacción de extensión de cebadores de 60 µl, se mezclaron 20 pmoles de biblioteca antisentido biotinilada con 40 pmoles de un cebador frío 5' (2X) y cantidades de traza de cebador 5' marcado <sup>32</sup>P, dNTP natural o modificado 0,5 mM en tampón IX SQ20 (Tris-HCl 120 mM, pH 7,8; KCl 10 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mM; MgSO<sub>4</sub> 7 mM, Tritón X-100 al 0,1 % y 0,1 mg/ml de ASB y 0,25 U/ml de polimerasa de KOD (Exo-). La mezcla se enfrió antes de añadir ADN polimerasa y la reacción se llevó a cabo a 68 °C durante 2 h, acto seguido se enfrió a 10 °C. La fracción de cada una de las reacciones de biblioteca se analizó en gel de urea TBU al 10 % junto con cebador marcado libre. Se analizó una pequeña alícuota en geles desnaturizantes que fueron expuestos a pantallas fluorescentes y se obtuvieron imágenes con fosforimager de Fuji, las bandas se cuantificaron con el software ImageGauge 4.0 y los resultados se representaron en un gráfico en el software Graph pad Prism 6.05. Para preparar bibliotecas iniciales, se llevaron a cabo reacciones de extensión de cebadores a gran escala usando de una biblioteca aleatoria antisentido biotinilada maestra capturada en perlas de estreptavidina y agarosa de alta capacidad de Pierce™ (Life Technologies). Se obtuvieron rendimientos más bajos de la biblioteca para ciertas combinaciones de dos nucleósidos modificados, por ejemplo, 28 ± 1,3 % para Nap-dC/Nap-dU, 40 ± 5,2 % para Nap-dC/MOE-dU, y 43 ± 2,7 % para PP-dC/Nap-dU, en comparación con 100 % del control de biblioteca de ADN (dC/dT) sin modificar. Se calculó la frecuencia de cada nucleótido a partir de los resultados de la secuenciación obtenidos de la biblioteca inicial y del molde aleatorio antisentido maestro usado para generar cada una de las bibliotecas con una y dos bases modificadas. El molde antisentido aleatorio maestro (30N) se sintetizó químicamente con una relación 1:1:1:1 de dA:dG:dC:dT (TriLink Biotechnologies) a escala de 1 µM. Las bibliotecas de una y dos bases modificadas aleatorias iniciales se sintetizaron enzimáticamente en una reacción a gran escala y se usaron en experimentos de selección. Estas bibliotecas se sometieron a secuenciación junto con los grupos enriquecidos y las frecuencias de nucleótidos se representaron en un gráfico con un total del 100 % para las cuatro bases en la región aleatoria de 30N. No se observó una desviación significativa en las frecuencias de nucleótidos cuando la composición de base de las bibliotecas se determinó usando secuenciación profunda en comparación con una biblioteca de molde de ADN natural sintética de partida y la biblioteca inicial de control de ADN no modificado sintetizada enzimáticamente (datos no mostrados).

Las bibliotecas se usaron para seleccionar los aptámeros que se unen a PCSK9. Las selecciones se llevaron a cabo sustancialmente como se notificó anteriormente usando sulfato de dextrano como competidor polianiónico para un total de seis rondas aplicando una dilución creciente de la diana durante cada ronda sucesiva de selección. Véase la Tabla 1 (R1 = ronda 1, R2 = ronda 2, etc.). La selección se inició mezclando bibliotecas aleatorias modificadas (o sin modificar de control) (≥ 1000 pmol) y una proteína diana marcada con His recombinante humana, PCSK9, que estaba presente a una concentración de 0,5 µM, en un volumen de 100 µl. Los complejos seleccionados se separaron en Dynabeads® de captura con etiqueta His magnéticos, las secuencias sin unión se lavaron, los aptámeros seleccionados se eluyeron y amplificaron por PCR usando nucleótidos naturales y cebador de biotina 3'. El ADN bicatenario natural biotinilado en el extremo 3' se capturó en esferas C1 de estreptavidina de Dynabeads® MyOne™, las cadenas sentido se eliminaron por desnaturización alcalina y se sustituyeron con dC modificado y o dU en las reacciones de extensión de cebadores para regenerar un grupo enriquecido y se repitió el ciclo de selección con la proteína diluida. La concentración de la proteína para la siguiente ronda de SELEX se determinó basándose en la relación de señal a fondo calculada a partir del valor del tiempo del ciclo crítico (Ct) para cada muestra.

Tabla 1: Condiciones de selección *in vitro*

Composición de la biblioteca	ADN de R1 [nM]	ADN de R2-R6 [nM]	PCSK9 [nM]					
			R1	R2	R3	R4	R5	R6
dC/dT (ADN de control)	10.000	100	500	100	50	50	50	50
Nap-dC/dT	10.000	100	500	100	100	10	10	0,1
PP-dC/dT	10.000	100	500	100	100	100	100	10
dC/Nap-dU	10.000	100	500	100	50	50	5	0,5
dC/PP-dU	10.000	100	500	100	100	100	10	1

(continuación)

Composición de la biblioteca	ADN de R1 [nM]	ADN de R2-R6 [nM]	PCSK9 [nM]					
			R1	R2	R3	R4	R5	R6
dC/MOE-dU	10.000	100	500	100	100	100	100	100
dC/Tyr-dU	10.000	100	500	100	100	100	50	5
dC/Thr-dU	10.000	100	500	100	100	100	100	10
Nap-dC/Nap-dU	10.000	100	500	100	50	10	1	0,1
Nap-dC/PP-dU	10.000	100	500	100	100	10	1	0,1
Nap-dC/MOE-dU	10.000	100	500	100	100	100	10	1
Nap-dC/Tyr-dU	10.000	100	500	100	100	10	1	0,1
Nap-dC/Thr-dU	10.000	100	500	100	100	100	10	1
PP-dC/PP-dU	10.000	100	500	100	100	100	10	1
PP-dC/Nap-dU	10.000	100	500	100	100	100	10	1
PP-dC/MOE-dU	10.000	100	500	100	100	100	100	100
PP-dC/Tyr-dU	10.000	100	500	100	50	10	1	0,1
PP-dC/Thr-dU	10.000	100	500	100	100	100	10	1

El cebador 5' para amplificación estaba compuesto por una cola de (AT<sub>4</sub>) y el cebador 3' estaba compuesto por una cola de (A-biotina)<sub>2</sub>-T<sub>8</sub> (SEQ ID NO: 82), que evita la adición de dC o dU modificado cuando se sintetizan las bibliotecas modificadas.

5

Tabla 2: Secuencia de cebadores molde de ADN natural, usados en SELEX

Nombre	Secuencia
Anti-AB2-30N41.36 SEQ ID NO: 1	(Ab2)TTTTTTTTCTCTTTCTCTTCTCTCTTTCTCC30NGACCCACCCAGCGTGG
(AT) <sub>4</sub> -5P41 SEQ ID NO: 2	ATATATATCCACGCTGGGTGGGTC
(AB) <sub>2</sub> (T) <sub>8</sub> -3P3 SEQ ID NO: 3	(Ab2)TTTTTTTTCTCTTTCTCTTCTCTCTTTCTCC

Después de seis rondas de selecciones, los aptámeros que contenían nucleótidos naturales fueron sometidos a secuenciación usando el instrumento Ion Torrent PGM. El análisis de secuencia se llevó a cabo usando un software habitual usando de alineación de lote local. Los datos del análisis de secuencia de todos los grupos enriquecidos demostraron que las combinaciones de bibliotecas con dos modificaciones resultaron en una mayor diversidad de las secuencias enriquecidas en comparación con las bibliotecas con modificación única (datos no mostrados). Para analizar la afinidad de unión de los aptámeros, se seleccionó un conjunto amplio de secuencias que representara no solo las secuencias únicas de alta copia, sino también las secuencias de baja copia de familias distintas (datos no mostrados). Todos los aptámeros se sintetizaron químicamente mediante la química de fosoramiditas en fase sólida estándar usando reactivos de fosoramiditas modificadas/no modificadas. Se analizaron todos los aptámeros inicialmente como 40 mers truncados que contenían una región aleatoria de 30 nucleótidos y 5 nucleótidos adicionales de regiones fijas de cebadores de los extremos 5' y 3' para comprobar sus afinidades de unión a PCSK9 en solución con ensayos de unión con filtros radiomarcados. Los aptámeros truncados (40 mers) comprendían 10 nucleótidos de las regiones fijas. La biblioteca de ADN de control sin modificar (dC/dT) no dio lugar a ninguna secuencia activa ( $K_d < 32$  nM), lo que era de esperar ya que la afinidad del grupo por esta biblioteca era uniforme (datos no mostrados) y también los datos de secuenciación profunda no arrojaron ninguna secuencia multicopia enriquecida (datos no mostrados). Las bibliotecas con única modificación, con la modificación Nap (naftil) en dC o en dU dio lugar a aptámeros que tenían afinidad por la diana, sin embargo, los aptámeros que tenían mayor afinidad por la diana se obtuvieron con Nap (resto naftilo) o PP (resto bencilo) modificado con dC y Tyr (resto tirosilo) modificado con dU (**Fig. 2**). El reemplazo de Tyr-dU con dT abolió la unión a la diana, lo que indica la importancia de los restos tirosilo para las interacciones de unión a la superficie diana de la PCSK9 (datos no mostrados). Los datos de afinidad demostraron que los aptámeros de nucleótidos con dos modificaciones, en general, tenían una mayor afinidad que los aptámeros de nucleótidos con modificación única y también proporcionaron un mayor número de aptámeros que se unieron a PCSK9 en comparación con los aptámeros de nucleótidos con modificación única (**Fig. 3**). Además, los aptámeros de nucleótidos con

30

modificación única de alta copia tienen afinidades promedio entre 0,1-100 nM, mientras que los aptámeros de nucleótidos con dos modificaciones de alta copia tienen afinidades promedio  $\leq 0,1$  nM.

5 En la siguiente tabla 3 se muestra un resumen de los datos que comparan los aptámeros con modificación única (40-mers) y los aptámeros con doble modificación (40-mers) para PCSK9.

Tabla 3. Sumario de los datos de unión de los aptámeros con modificación única y doble para PCSK9

Diana de PCSK9						
Categoría	Modificación en la posición 5 del aptámero	% de aptámeros analizados con una $K_d \leq 10$ nM	N.º total de aptámeros analizados	Kd de aptámero con mayor afinidad por la diana	N.º total de aptámeros sin unión	% de aptámeros sin unión
Control (sin modificar)	dC/dT	0 %	19	N/D	19	100 %
Mod. única	NapdC/dT	57 %	23	0,25 nM	6	26 %
	PPdC/dT	0 %	8	N/D	8	100 %
	dC/NapdU	29 %	24	0,28 nM	11	46 %
	dC/PPdU	22 %	18	0,18 nM	12	67 %
	dC/MOEdU	0 %	7	N/D	7	100 %
	dC/TyrdU	0 %	15	20 nM	9	60 %
	dC/ThrdU	0 %	18	N/D	18	100 %
Dos mod.	NapdC/NapdU	70 %	37	0,16 nM	7	19 %
	NapdC/PPdU	72 %	32	0,05 nM	7	22 %
	NapdC/MOEdU	20 %	25	0,19 nM	14	56 %
	NapdC/TyrdU	65 %	34	0,03 nM	10	29 %
	NapdC/ThrdU	3 %	40	0,23 nM	38	95 %
	PPdC/PPdU	44 %	34	0,13 nM	9	26 %
	PPdC/NapdU	78 %	32	0,14 nM	5	16 %
	PPdC/MOEdU	17 %	6	0,1 nM	5	83 %
	PPdC/TyrdU	80 %	35	0,04 nM	5	14 %
	PPdC/ThrdU	0 %	35	N/D	35	100 %

10 Basándose en la información en la tabla 3, el porcentaje de todos los aptámeros con modificación única analizados que no mostraron unión fue del 62 %. La falta de unión se define como un aptámero que tiene una  $K_d$  de 320 nM o superior. El porcentaje de todos los aptámeros con modificación única con una  $K_d \leq 10$  nM fue inferior al 21 %, y la  $K_d$  promedio para todos los aptámeros con modificación única fue de 5,2 nM. Por el contrario, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones (mod. doble) analizados que no mostraron unión fue de 43 %. Además, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones con una  $K_d \leq 10$  nM fue de 47 %, y la  $K_d$  promedio para todos los aptámeros con dos modificaciones fue de 0,12 nM.

**Ejemplo 2: Truncamiento de aptámeros con modificación doble**

20 Se investigó el efecto de un mayor truncamiento en la unión de aptámeros de alta afinidad ( $K_d < 1$  nM). Los aptámeros se truncaron a 30 mers, lo que supone una reducción del 25 % de la longitud. La combinación PP-dC/Tyr-dU tuvo el mayor número de aptámeros que pudieron ser truncados a 30 mers, conservando la afinidad de unión (Fig. 4A). Los aptámeros con una única base modificada mostraron una truncabilidad del 21,5 % (barra azul, 3/14), los aptámeros

Nap-dC con dos bases modificadas con dUs modificados mostraron una truncabilidad del -23 % (barra roja, 11/48), mientras que los PP-dC con dos bases modificadas con otros dUs modificados mostraron una mayor truncabilidad del 60 % (barra verde, 27/45). El porcentaje y el número de 40 mers que podían truncarse a 30 mers eran también mayores para combinaciones con dos bases modificadas de PP-dC con PP-dU, Nap-dU, o Tyr-dU en comparación con otras bibliotecas (**Fig. 4B**). Se analizaron menos aptámeros de las bibliotecas con una única base modificada puesto que solo había 14 aptámeros con afinidad  $\leq 1$  nM de las tres bibliotecas (40 mers, en el área gris de la **Fig. 4B** para un mod. única). Por el contrario, el número de aptámeros de las bibliotecas con dos bases modificadas con alta afinidad fue de 93 (40 mers, en el área gris de la **Fig. 4B** para dos mod.), 48 para Nap-dC con dUs modificados y 45 para PP-dC con dUs modificados. La línea horizontal negra en cada una de las bibliotecas indica el valor de la mediana para todos los aptámeros de esa biblioteca. Sin pretender quedar ligados a teoría particular alguna, es posible que la cadena de carbono extendida en la base modificada PP (en comparación con otras modificaciones) ayude a alcanzar epítomos inaccesibles en la superficie de la diana y no necesite regiones fijas de cebadores para el plegado estructural y las interacciones efectivas de unión a la proteína.

También se evaluó la especificidad de los aptámeros de PCSK9 con respecto a otras proproteínas convertidas (PCs). Se seleccionaron los tres aptámeros de mayor afinidad de cada biblioteca (n=33, 40 mers; ninguno de la biblioteca de control de ADN sin modificar, solo dos aptámeros de la biblioteca dC/Tyr-dU y un aptámero de la biblioteca PP-dC/MOE-dU) y se analizó su especificidad con otras PCs. Los resultados demostraron que los aptámeros eran específicos para la PCSK9 y no se observó ninguna unión detectable con otras PCs (**Fig. 5**) a concentraciones de 100 nM.

La reactividad cruzada de especies de los aptámeros truncados (n=41, 30 mers) con valores de Kd de  $\leq 1$  nM se analizó para la PCSK9 de roedores (ratón y rata) y del mono Rhesus (véase la Tabla 4). El porcentaje de identidad entre PCSK9 de varias especies se muestra en la parte superior del gráfico de la **Fig. 6**. La PCSK9 de ratón/rata es aproximadamente un 76 % idéntica a las proteínas de mono y humano. La mayoría de los aptámeros se unieron a la PCSK9 de mono Rhesus con afinidades similares (96,4 % de identidad), sin embargo, pocos aptámeros de bibliotecas con dos modificaciones (PP-dC/Nap-dU y PP-dC/Tyr-dU) se unieron a la PCSK9 de rata y ratón (identidad ~76 %). Estos resultados demostraron que ciertas bibliotecas con dos bases modificadas (por ejemplo, PP-dC/Nap-dU y PP-dC/Tyr-dU) generaron aptámeros que pueden unirse tanto a la PCSK9 de roedores como a la de humanos/monos con afinidades similares (**Fig. 6**).

Tabla 4. Actividad de unión entre especies de aptámeros con modificación doble y única

Biblioteca	Kd de PCSK9 de humano (pM)	Kd de PCSK9 de mono (pM)	Kd de PCSK9 de ratón (pM)	Kd de PCSK9 de rata (pM)
Nap-dC/dT	150	149	-	-
Nap-dC/dT	114	56	-	-
dC/Nap-dU	223	174	-	-
Nap-dC/Nap-dU	362	461	-	-
Nap-dC/Nap-dU	609	1710	-	-
Nap-dC/Nap-dU	144	351	-	-
Nap-dC/Pp-dU	379	934	-	-
Nap-dC/Pp-dU	68	924	-	-
Nap-dC/Moe-dU	82	83	-	-
Nap-dC/Moe-dU	172	169	-	-
Nap-dC/Tyr-dU	411	177	-	-
Nap-dC/Tyr-dU	484	70	-	-
Nap-dC/Tyr-dU	191	193	-	-
Nap-dC/Tyr-dU	805	987	-	-
Pp-dC/Pp-dU	186	189	-	-
Pp-dC/Pp-dU	162	198	-	-
Pp-dC/Pp-dU	220	1150	-	-
Pp-dC/Pp-dU	564	638	-	-

(continuación)

Biblioteca	Kd de PCSK9 de humano (pM)	Kd de PCSK9 de mono (pM)	Kd de PCSK9 de ratón (pM)	Kd de PCSK9 de rata (pM)
Pp-dC/Pp-dU	53	106	-	-
Pp-dC/Pp-dU	213	229	-	-
Pp-dC/Pp-dU	378	306	-	-
Pp-dC/Pp-dU	93	204	-	-
Pp-dC/Pp-dU	413	402	-	-
Pp-dC/Nap-dU	283	247	23800	-
Pp-dC/Nap-dU	70	74	742	1440
Pp-dC/Nap-dU	69	117	-	-
Pp-dC/Nap-dU	111	140	500	680
Pp-dC/Nap-dU	136	205	3820	18100
Pp-dC/Nap-dU	800	780	-	-
Pp-dC/Nap-dU	127	128	1950	45000
Pp-dC/Tyr-dU	701	-	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	187	109	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	93	-	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	61	45	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	62	-	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	451	350	1090	858
Pp-dC/Tyr-dU	12	21	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	122	-	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	28	-	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	148	-	-	-
Pp-dC/Tyr-dU	109	-	-	-

"-" indica que no se detectó unión en el ensayo

### Ejemplo 3: Unión de aptámero en ensayos tipo sándwich

- 5 El método SELEX a veces produce aptámeros que se unen preferentemente a un epítipo "aptagénico" dominante en la superficie en la diana. Por lo tanto, los informes sobre pares tipo sándwich de aptámeros están limitados en la bibliografía. Se pueden emplear modificaciones en el método de selección para buscar los aptámeros que pueden unirse a diferentes epítipos en la proteína diana, tal como el aislamiento de aptámero multivalente (MAI-SELEX), plataforma de descubrimiento a base de matrices para selecciones tipo sándwich de aptámero multivalente (AD-MAP),
- 10 en la que el aptámero primario se usa en exceso para bloquear el primer epítipo en un esfuerzo por descubrir el segundo aptámero que se une a un epítipo de señalización no competitivo. Para demostrar si la diversidad química ampliada generada por la multiplicidad en las modificaciones en dC y dU en conjunto al seleccionar aptámeros que pueden unirse a diferentes epítipos en la superficie de la diana, se desarrollaron ensayos de cribado de pares tipo sándwich a base de perlas en los que se usaron perlas magnéticas acopladas a avidina Luminex® MagPlex® para
- 15 capturar el aptámero primario biotinilado (**Fig. 7A**). Las perlas de captura con aptámeros individuales se usaron mezcladas entre sí para buscar el segundo compañero de unión en una combinación multiplex por pares (**Fig. 7A**). Para este experimento, se usaron aptámeros de 40 mer ( $n=96$ , 9216 pares) con afinidad  $K_d \leq 1$  nM de bibliotecas con una y dos bases modificadas. En resumen, los aptámeros individuales (0,05 pmol por muestra) se capturaron en un tipo de perla de avidina MagPlex única y se mezclaron entre sí (24 perlas en un experimento, 1000 perlas por muestra)
- 20 y se capturaron durante 20 min a temperatura ambiente con agitación a 1850 rpm. Las perlas se lavaron con IX SBT durante 2 min seguido de un lavado con biotina libre 0,5 mM durante 5 min en 1XSBT, seguido de 3 lavados con IX SBT durante 2 min cada uno. Las perlas se bloquearon con estreptavidina libre durante 5 min y se lavaron de nuevo durante 2 min con IX SBT. Los 24 tipos de perlas diferentes con aptámeros individuales se mezclaron entre sí para el cribado del compañero tipo sándwich para cada uno del aptámero de captura. Un aptámero de detección o secundario se diluyó a 500 nM en 1XSBT, se enfrió y se mezcló con PCSK9 (10 nM finales), incubándose a 25 °C durante 1 hora. Se añadieron 1000 perlas de captura y se incubaron durante 1 hora con agitación. A continuación se capturaron las perlas en un imán, se lavaron tres veces con IX SBT durante 2 min cada una y se volvieron a suspender en 75 µl de IX SBT con ASB al 0,1 % y 100 µM de DxSO<sub>4</sub>. A esto se añadieron 75 µl de ficoeritrina de estreptavidina (5 µg/ml finales) y se incubaron a 25 °C durante 20 min con agitación. Las perlas finalmente se lavaron de nuevo durante 2 min
- 25

con IX SBT y se leyeron en la máquina Luminex 3D xMAP.

Las bibliotecas con base única modificada generaron pocos pares tipo sándwich (tres), mientras que la adición de aptámeros de bibliotecas con dos bases modificadas en combinación con aptámeros de una única base modificada dio lugar a más pares tipo sándwich (22 pares). Por otra parte, el número de pares tipo sándwich por biblioteca aumentó drásticamente cuando ambos aptámeros socios (captura y detección) procedían de las bibliotecas con dos bases modificadas (45 pares, **Fig. 7C, Fig. 7B**).

Los resultados de la unión a múltiples epítomos del cribado tipo sándwich sugieren que el aumento de la diversidad química en la biblioteca aleatoria inicial dio lugar a aptámeros modificados que pueden unirse a sitios no competitivos en la superficie de la diana. A continuación, los pares tipo sándwich que dieron lugar a las señales más altas (concentración de PCSK9 de 10 nM; 0,75 % de todos los pares analizados, 70 pares de 9216; **Fig. 7C**) se midieron con respecto a las respuestas dependientes de la concentración de PCSK9 con un subconjunto de resultados mostrados en las **Figs. 8A** (las señales dependientes de la concentración se muestran para el aptámero primario con una única base modificada dC/PP-dU y el mejor secundario que funcionó bien fue el aptámero con dos bases modificadas Nap-dC/Nap-dU [triángulos]) y **8B** (las señales dependientes de la concentración se muestran para el aptámero secundario con dos bases modificadas Nap-dC/Nap-dU y el mejor primario que funcionó bien fue el aptámero con única base modificada dC/PP-dU [cuadrados cerrados]). Es interesante, un par específico, que constituye un primario con única base modificada (PP-dU, afinidad, Kd de 175 pM) y un secundario con dos bases modificadas (Nap-dU/Nap-dC, afinidad, Kd de 531 pM), dio lugar a la señal robusta que era mucho más alta que cualquier otro par en una orientación (**Fig. 8C**). Sin embargo, cuando este aptámero primario con única base modificada fue cambiado por un aptámero secundario, la señal se perdió, lo que indicaba que la orientación de los aptámeros era importante para este par tipo sándwich. Este par tipo sándwich de aptámeros también puede medir la actividad de una proteína mutante con ganancia de función, PCSK9 D374Y (**Fig. 8D**), que tiene una mayor afinidad por LDL-R que la PCSK9 de tipo salvaje y se notificó que se sobreexpresada en pacientes con la forma grave de hipercolesterolemia familiar (HF). Los valores de sensibilidad y MFU fueron mayores para la PCSK9 D374Y mutante que para la proteína de tipo salvaje.

La especificidad de un par tipo sándwich de aptámeros también se midió por la falta de señal endógena cuando la PCSK9 de humano recombinante se adicionó con suero de ternero recién nacido (NBS) en comparación con plasma humano (datos no mostrados).

Este par tipo sándwich se caracterizó además para desarrollar un ensayo tipo sándwich de aptámeros para detectar concentraciones circulantes de PCSK9 en plasma en muestras clínicas de humanos. El rendimiento del ensayo tipo sándwich se evaluó realizando estudios tales como la sensibilidad (**Fig. 9A y 9B y Tablas 5 y 6**), la precisión (**Tablas 7 y 8**), la exactitud (**Tabla 9**) y mediciones de linealidad de dilución en plasma (**Fig. 10**), todas las cuales confirmaron una ventana de ensayo robusta. Para evaluar la linealidad de dilución de la muestra del ensayo, se llevó a cabo un ensayo tipo sándwich con muestras que contenían y/o estaban adicionadas con altas concentraciones de PCSK9. Las muestras de plasma (n=5) se diluyeron en serie con el tampón del ensayo para ajustar los valores dentro del intervalo dinámico del ensayo.

El límite de detección (LLOD), definido como la concentración de PCSK9 (40 pg/ml) que otorga un valor UFR superior al UFR medio del blanco (tampón de dilución) más 3 desviaciones típicas, se muestra en la Tabla 5. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el límite superior de cuantificación (ULOQ), definidos como las concentraciones más bajas y más altas de PCSK9 que pueden cuantificarse usando un ajuste de logística de 4 parámetros (4PL) aplicado a las curvas estándar que da lugar a una recuperación del 80-120 % de las concentraciones diana conocidas, se muestran en la Tabla 6. Para determinar la variabilidad intraensayo, cinco muestras de plasma de concentraciones conocidas fueron analizadas 16 veces en una placa única. Véase la Tabla 7. Los coeficientes de variabilidad (CV) dentro del ensayo variaron de 4,3 % a 6 %. Para determinar la variabilidad interensayo, se midieron cinco muestras de plasma de concentraciones conocidas en cinco ensayos separados. Véase la Tabla 8. Los CV entre los ensayos variaron de 2,3 % a 9,8 %. Finalmente, para determinar la exactitud en la medición del diana, cinco muestras de plasma se adicionaron con diferentes cantidades de PCSK9 y se midieron. Se evaluó la recuperación de los niveles de PCSK9 adicionados en el intervalo del ensayo. Véase la Tabla 9. El porcentaje de recuperación de las muestras promedió de 83,1 % a 137,5 % de la diana adicionada.

Se evaluó un conjunto de muestras de plasma obtenidas de dos grupos de individuos, un grupo de control (n=42) y otro grupo de estudio en el que los sujetos se sometieron a terapia con estatina Lipitor® (n=42, por autoinforme) para determinar si el ensayo puede diferenciar estadísticamente entre estos dos grupos, dado que se conoce que el uso de estatinas aumenta las concentraciones plasmáticas de PCSK9. El ensayo tipo sándwich se desarrolló usando un SOMAmer de captura o primario (11723-5) como un aptámero con una única base modificada (PP-dU/dC) y un aptámero secundario o de detección (11727-20) como un aptámero con dos bases modificadas (Nap-dC/Nap-dU).

Estos resultados indicaron que el ensayo tipo sándwich de aptámero puede diferenciar estadísticamente entre los dos grupos con un valor P de 0,0044 (**Fig. 11**) mediante el análisis de Mann-Whitney y que este ensayo podría ser de utilidad para identificar a las personas que podrían beneficiarse de la terapia anti-PCSK9 debido a sus altas concentraciones plasmáticas de PCSK9.

También se usó un ensayo tipo sándwich de aptámero para medir las concentraciones de PCSK9 en sobrenadantes libres de células de células HepG2 que sobreexpresan PCSK9 para identificar los clones de sobreexpresión y demostrar la utilidad de investigación del ensayo (**Fig. 12**). La PCSK9 se sobreexpresó en células HepG2 usando el sistema LentiViral de SBI System Biosciences (LV300A-1). La línea celular HepG2 fue transducida con un clon de expresión lentiviral para la PCSK9 humana de tipo salvaje obtenido de Origene (RC22000L1) para la generación de una línea celular estable. Se examinó un total de 96 clones individuales para comprobar su capacidad de secretar PCSK9. La cantidad relativa de PCSK9 secretada en el medio se midió mediante el ensayo tipo sándwich de aptámeros para cada clon y se comparó con la expresión de las células HepG2 de tipo salvaje. El número de células usadas para producir la proteína recombinante se normalizó mediante el uso del ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo® Luminescent. El clon número 45 secretó ~ 100 veces más PCSK9 que las células HepG2 de tipo salvaje.

Tabla 5: Sensibilidad de tipo sándwich (límite inferior de detección)

Cuantificación de LLoD		
N.º	Blanco	PCSK9 (40 pg/ml)
1	127,5	175,5
2	124	175,5
3	122	179
4	129	181,5
5	136	189,5
6	125,5	185,5
7	117	174,5
8	127,5	170
9	115,5	173,5
10	121	179,5
11	128	166
12	120,5	181,5
13	120,5	181,5
14	130,5	170,5
15	115,5	172
16	130	164
<b>CV (%)</b>	<b>4,73</b>	<b>3,93</b>

Tabla 6: Sensibilidad de tipo sándwich (límite inferior de cuantificación)

	Cuantificación de ULoQ		Cuantificación de LLoQ	
	Logística 4PL (R <sup>2</sup> =0,99)		Logística 4PL (R <sup>2</sup> =0,99)	
	PCSK9 (ng/ml)	% de recuperación est.	PCSK9 (ng/ml)	% de recuperación est.
Est 1	100	Fuera de intervalo	5	100,1
Est 2	31,6000	72,3	2,5	99,3
Est 3	9,9856	94,5	1,25	102,6
Est 4	3,1554	102,2	0,625	100,2
Est 5	0,9971	112,1	0,3125	98,0
Est 6	0,3151	108,9	0,156	98,8

# ES 3 013 534 T3

(continuación)

	Cuantificación de ULoQ		Cuantificación de LLoQ	
	Logística 4PL ( $R^2 = 0,99$ )		Logística 4PL ( $R^2 = 0,99$ )	
	PCSK9 (ng/ml)	% de recuperación est.	PCSK9 (ng/ml)	% de recuperación est.
Est 7	0,0996	89,1	0,078	105,5
Est 8	0,0315	54,6	0,039	79,9
Est 9	0,0099	Fuera de intervalo	0,020	82,6
Est 10	0,0031	Fuera de intervalo	0,010	67,2
Est 11	0,0010	Fuera de intervalo	0,005	Fuera de intervalo

**Tabla 7: Precisión dentro de los ensayos**

PCSK9 (ng/ml)					
N.º	Plasma 1	Plasma 2	Plasma 3	Plasma 4	Plasma 5
1	139,4	118,8	196,1	220,8	104,4
2	149,4	120,7	164,4	208,5	84,7
3	142	115,9	186,4	224,9	102,3
4	151,4	125,8	196,7	227,1	102
5	147,7	125,6	193,9	226,3	96,7
6	146,6	125,3	183,2	235,2	98,5
7	148,4	123,7	179,4	237,8	100,9
8	133,8	127,6	172	245,1	94,3
9	154,7	130,2	191,3	240,3	100,3
10	147	117,5	181,7	228,3	104,2
11	133	121,3	190,6	229,5	89,3
12	150,9	127,9	189,8	231,3	98
13	146	121,1	193,2	218,5	91,4
14	152,9	125,8	195,2	232,5	100,5
15	126,8	117,7	173,1	220,4	88,2
16	153,6	109	172,9	235,6	93,8
<b>CV (%)</b>	<b>5,4</b>	<b>4,3</b>	<b>5,3</b>	<b>3,9</b>	<b>6</b>

5

**Tabla 8: Precisión entre ensayos**

PCSK9 (ng/ml)					
N.º	Plasma 1	Plasma 2	Plasma 3	Plasma 4	Plasma 5
<b>Análisis 1</b>	143,8	111,6	187,0	210,7	99,5
<b>Análisis 2</b>	130,2	99,6	176,7	199,3	93,0
<b>Análisis 3</b>	117,3	106,2	164,4	200,8	83,2
<b>Análisis 4</b>	141,7	111,8	192,2	206,1	90,7
<b>Análisis 5</b>	151,5	112,6	197,1	206,9	91,8
<b>CV (%)</b>	<b>9,8</b>	<b>5,1</b>	<b>7,1</b>	<b>2,3</b>	<b>6,4</b>

Tabla 9: Exactitud de medición diana

Muestra		Ninguno (sin adiciones)	+300 (ng/ml)	+100 (ng/ml)	+30 (ng/ml)
Plasma 1	PCSK9 (ng/ml)	92,4	359,0	192,2	133,7
	Recuperación (%)	-	88,9	99,8	137,5
Plasma 2	PCSK9 (ng/ml)	76,9	351,7	179,8	109,2
	Recuperación (%)	-	91,6	102,9	107,6
Plasma 3	PCSK9 (ng/ml)	137,4	454,5	256,9	172,9
	Recuperación (%)	-	105,7	119,5	118,3
Plasma 4	PCSK9 (ng/ml)	172,0	474,8	275,5	202,3
	Recuperación (%)	-	100,9	103,5	101,1
Plasma 5	PCSK9 (ng/ml)	70,1	334,5	190,6	95,0
	Recuperación (%)	-	88,1	120,5	83,1

#### Ejemplo 4: Inhibición de la actividad de la diana mediante aptámeros con doble modificación

5 Para hallar inhibidores de PCSK9 que bloqueen la unión de PCSK9 a LDL-R, 41 aptámeros truncados de 30 mer con  $K_d \leq 1$  nM se examinaron en un ensayo a base de placas en el que se recubrieron las placas con LDL-R y se detectó la unión de PCSK9 biotinilada usando el conjugado estreptavidina-PRP mediante reactivos quimioluminiscentes (**Fig. 13**). El LDL-R recombinante (Acro Biosystems) se recubrió en las placas ELISA (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante la noche a 4 °C, y luego se lavaron los pocillos y se bloquearon con Super Block (Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente. La PCSK9 biotinilada (Acro Biosystems, marcada con Avi) y el aptámero se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h, después se añadieron a la placa ELISA y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. La concentración máxima de PCSK9 fue de 0,5 nM y la concentración máxima del aptámero fue de 100 nM, y luego se diluyeron en serie mediante  $\frac{1}{2}$  log para la curva de inhibición. Se añadió a los pocillos la PRP conjugada con estreptavidina (Invitrogen, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, Se añadieron sustratos de quimioluminiscencia sensibles a pico (Invitrogen), la luminiscencia se midió en el luminómetro (Hidex Plate Chameleon) y los datos se representaron en un gráfico en el software Graph Pad Prism 6.0 para calcular los valores  $CE_{50}$ . Se usó un anticuerpo neutralizante de PCSK9 (BPS Bioscience) como control.

20 Los resultados del ensayo de inhibición (analizando concentraciones de aptámeros a 100 nM y PCSK9 a 1 nM) mostraron que el 70 % de los aptámeros fueron inhibidos (más del 90 % de inhibición) y que algunos de los aptámeros con dos modificaciones inhibían fuertemente las interacciones de PCSK9 con LDL-R (datos no mostrados). Los aptámeros se evaluaron además en función de las curvas dosis-respuesta para determinar sus valores  $CE_{50}$  para inhibición. Los resultados indicaron que muchos de los inhibidores inhibían fuertemente la interacción de PCSK9 con LDL-R con una  $CE_{50}$  en el intervalo de 0,1-1 nM (Fig. 14). Para demostrar el posible valor terapéutico de aptámeros con dos modificaciones, se seleccionó un aptámero de PCSK9 con reactividad cruzada de especie (30 mer, SEQ ID. 11733-91\_5 (11733-198)) para medir la afinidad de la diana por las PCSK9 de varias especies. Este aptámero tuvo una afinidad de 14,7, 11,3, 5,2, 77 y 165 pM con la PCSK9 de humano (tipo salvaje), mono Rhesus, humano (mutante GOF D374Y), ratón y rata, respectivamente (**Fig. 15A**). Este aptámero también bloqueó la interacción de PCSK9 y LDL-R de humano de tipo salvaje con una  $CE_{50}$  de 2,1 nM y la interacción de LDL-R y mutante GOF PCSK9 D374Y con una  $CE_{50}$  de 3,6 nM (**Fig. 15B**). Se evaluó la especificidad de este aptámero para la PCSK9 en comparación con otras PCs, y los resultados mostraron que este aptámero se unía solo a la PCSK9 y no a otras PCs (datos no mostrados).

35 Para comprobar el efecto neutralizante del aptámero de PCSK9 en el bloqueo de la degradación del LDLR, se analizó un aptámero PP-dC/Nap-dU en un ensayo de inversión de la captación de LDL en el que se incubaron células HepG2 de tipo salvaje durante 16 horas con PCSK9 recombinante, y luego se lavaron las células y se añadió LDL marcado con fluorescencia durante 3 horas. Los resultados mostraron que el aptámero puede revertir la captación de LDL con una  $CE_{50}$  de 159 nM (**Fig. 16 y Fig. 17**). Además, el tratamiento con el aptámero puede aumentar los niveles de LDL-R en las células HepG2 que sobreexpresan PCSK9, según lo medido por FACS (**Fig. 17**). Estos resultados con un aptámero de con reactividad cruzada de especie, alta afinidad, truncado, específico y altamente potente sugieren que el posible valor terapéutico de un aptámero con dos bases modificadas podría optimizarse aún más en cuanto a su longitud y bioestabilidad mediante una modificación posterior a SELEX.

#### Ejemplo 5: Estabilidad en suero de aptámeros con doble modificación

45 Para determinar la estabilidad en suero de los aptámeros con doble modificación en suero humano, se incubó 1  $\mu\text{M}$  de aptámero purificado en gel en suero humano combinado al 90 % en tampón PBS en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  a

## ES 3 013 534 T3

37 °C. En varios puntos temporales, se recogieron alícuotas de 20 µl y se añadió un volumen igual de mezcla de EDTA/formamida/tinte (Formamida 87,7 %, SDS, 0,03 %, EDTA sódico, 20 mM, Cianol de xileno, 0,05 %, Azul de bromofenol, 0,05 %, Naranja G, 0,1 %). Las mezclas de alícuotas se almacenaron a continuación a -20 °C. Antes del análisis, la mezcla de alícuota de 40 µl se diluyó con 100 µl de H<sub>2</sub>O y se extrajo con 150 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1. Las muestras se centrifugaron a 16.100 xg durante 15 minutos, y la fase acuosa que contenía el aptámero se eliminó y se almacenó a -20 °C hasta el análisis de gel.

Las muestras de aptámeros se cargaron en un gel desnaturalizante TBE PAGE al 15 % (urea 8 M), y el aptámero se tiñó con IX (~2 µM) SYBR Gold durante 10 minutos. La cantidad de aptámero de longitud completa en cada punto temporal se cuantificó usando el software de análisis FluorChemQ (AlphaInnotech).

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 10 y en la **Fig. 18**. La Tabla 10 muestra la composición de los aptámeros analizados en ese experimento, el porcentaje de aptámeros de longitud completa que queda después de 96 horas en suero humano al 90 % y la semivida de cada aptámero, que se calculó mediante un ajuste de regresión lineal usando datos cuantificados en gel en el software GraphPad Prism 7. La **Fig. 18** muestra el porcentaje de aptámero de longitud completa restante con el tiempo. En general, los aptámeros con doble modificación demostraron una mayor estabilidad en el suero humano a lo largo del tiempo que los aptámeros con una única modificación.

Tabla 10: Composición de aptámero.

Aptámero	longitud	mod dC	mod dU	N.º mod dC (%)	N.º mod dU (%)	N.º A (% A)	N.º C (% C)	N.º G (% G)	N.º T (% T)	% de FL a las 96 horas	Semivida (horas)
dC/dT	29	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	7 (24 %)	4 (14 %)	8 (28 %)	10 (34 %)	0	11
NapdC/dT	30	Nap-dC	ninguna	12 (40 %)	ninguna	4 (13,3 %)	ninguna	9 (30 %)	5 (16,7 %)	39	72
dC/NapdU	30	ninguna	Nap-dU	ninguna	5 (16,7 %)	10 (33,3 %)	6 (20,0 %)	9 (30 %)	ninguna	17	23
dC/PPdU	30	ninguna	PP-dU	ninguna	11 (36,7 %)	7 (23,3 %)	6 (20,0 %)	6 (20,0 %)	ninguna	57	53
NapdC/NapdU	30	Nap-dC	Nap-dU	5 (16,7 %)	4 (13,3 %)	9 (30 %)	ninguna	12 (40 %)	ninguna	65	101
NapdC/PPdU	30	Nap-dC	PP-dU	7 (23,3 %)	8 (26,7 %)	5 (16,7 %)	ninguna	10 (33,3 %)	ninguna	44	53
NapdC/MOE dU	30	Nap-dC	MOE-dU	12 (40 %)	3 (10,0 %)	6 (20,0 %)	ninguna	9 (30 %)	ninguna	40	43
NapdC/TyrdU	30	Nap-dC	Tyr-dU	11 (36,7 %)	6 (20,0 %)	3 (10,0 %)	ninguna	10 (33,3 %)	ninguna	104	690
PPdC/PPdU	30	PP-dC	PP-dU	7 (23,3 %)	8 (26,7 %)	6 (20,0 %)	ninguna	9 (30 %)	ninguna	108	633
PPdC/NapdU	30	PP-dC	Nap-dU	7 (23,3 %)	9 (30 %)	6 (20,0 %)	ninguna	8 (26,7 %)	ninguna	86	847
PPdC/TyrdU	30	PP-dC	Tyr-dU	6 (20,0 %)	12 (40 %)	7 (23,3 %)	ninguna	5 (16,7 %)	ninguna	75	907

**Ejemplo 6: Aptámeros que comprenden dos bases modificadas**

Las bibliotecas descritas en el Ejemplo 1 se usaron para seleccionar aptámeros que se unen a ErbB2, ErbB3, y PSMA. Las selecciones se llevaron a cabo para cada diana sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1. Para ErbB2 y ErbB3, se usaron las bibliotecas Nap-dC/dT; PP-dC/dT; y dC/Tyr-dU con modificación única; y las bibliotecas Nap-dC/Tyr-dU y PP-dC/Tyr-dU con doble modificación. Para PSMA, se usaron la biblioteca dC/dT sin modificar; las bibliotecas Nap-dC/dT; PP-dC/dT; dC/Nap-dU, dC-PP-dU, dC-MOE-dU, y dC/Tyr-dU con única modificación; y las bibliotecas Nap-dC/Nap-dU, Nap-dC/PP-dU, Nap-dC/MOE-dU, Nap-dC/Tyr-dU, PP-dC/PP-dU, PP-dC/Nap-dU, y PP-dC/Tyr-dU con doble modificación.

Como en el caso anterior, la biblioteca de ADN de control sin modificar (dC/dT), que se usó para PSMA, no produjo ningún aptámero que se uniera a la PSMA. Las bibliotecas con única modificación, con modificación Nap (resto naftilo) en dC o dU dieron como resultado aglutinantes para las tres dianas, sin embargo, las bibliotecas con doble modificación proporcionaron aptámeros con mayor afinidad en relación con las bibliotecas con una única modificación (Fig. 19A-C).

Un resumen de los datos que comparan los aptámeros con modificación única (40 mers) y los aptámeros con doble modificación (40 mers) para cada uno de PSMA, ErbB2 y ErbB3 se muestran en las tablas 11, 12 y 13, respectivamente.

Tabla 11. Resumen de los datos de unión para los aptámeros con modificación única y doble para PSMA

Diana de PSMA						
Categoría	Modificación en la posición 5 del aptámero	% de aptámeros analizados con una Kd ≤ 10 nM	N.º total de aptámeros analizados	Kd de aptámero con mayor afinidad por la diana	N.º total de aptámeros sin unión	% de aptámeros sin unión
Control (sin modificar)	dC/dT	0 %	6	N/D	6	100 %
Mod. única	NapdC/dT	36 %	25	0,5 nM	7	28 %
	PPdC/dT	0 %	7	N/D	7	100 %
	dC/NapdU	13 %	24	6,7 nM	19	79 %
	dC/PPdU	0 %	20	35,5 nM	17	85 %
	dC/MOEdU	0 %	1	N/D	1	100 %
	dC/TyrdU	5 %	21	6,3 nM	19	90 %
	dC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Dos mod.	NapdC/NapdU	12 %	17	1 nM	9	53 %
	NapdC/PPdU	12 %	17	0,5 nM	9	53 %
	NapdC/MOEdU	15 %	13	1,1 nM	7	54 %
	NapdC/TyrdU	58 %	26	0,3 nM	9	35 %
	NapdC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/PPdU	15 %	20	1,6 nM	8	40 %
	PPdC/NapdU	18 %	17	3 nM	10	59 %
	PPdC/MOEdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/TyrdU	0 %	24	38,9 nM	20	83 %
	PPdC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

N.E. es "no ensayado"; N/D es no aplicable o sin datos

Basándose en la información en la tabla 11, el porcentaje de todos los aptámeros con modificación única analizados que no mostraron unión fue del 71 %. La falta de unión se define como un aptámero que tiene una Kd de 320 nM o superior. El porcentaje de todos los aptámeros con única modificación con una Kd ≤ 10 nM fue del 12 %, y la Kd promedio de todos los aptámeros con modificación única fue de 12,3 nM. Por el contrario, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones (mod. doble) analizados que no mostraron unión fue de 54 %. Además, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones con una Kd ≤ 10 nM fue de 20 %, y la Kd promedio para todos los aptámeros con dos modificaciones fue de 6,6 nM.

10 Tabla 12. Resumen de los datos de unión de los aptámeros con modificación única y doble para ERBB2

Diana de ERBB2						
Categoría	Modificación en la posición 5 del aptámero	% de aptámeros analizados con una Kd ≤ 10 nM	N.º total de aptámeros analizados	Kd de aptámero con mayor afinidad por la diana	N.º total de aptámeros sin unión	% de aptámeros sin unión
Control (sin modificar)	dC/dT	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Mod. única	NapdC/dT	0 %	23	13,5 nM	12	52 %
	PPdC/dT	7 %	15	7,8 nM	8	53 %
	dC/NapdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	dC/PPdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	dC/MOEdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	dC/TyrdU	0 %	29	24,1 nM	27	93 %
	dC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Dos mod.	NapdC/NapdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	NapdC/PPdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	NapdC/MOEdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	NapdC/TyrdU	28 %	32	0,65 nM	10	31 %
	NapdC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/PPdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/NapdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/MOEdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/TyrdU	20 %	20	0,74 nM	13	65 %
	PPdC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

Basándose en la información en la tabla 12, el porcentaje de todos los aptámeros con modificación única analizados que no mostraron unión fue del 70 %. La falta de unión se define como un aptámero que tiene una Kd de 320 nM o superior. El porcentaje de todos los aptámeros con modificación única con una Kd ≤ 10 nM fue inferior al 2 %, y la Kd promedio para todos los aptámeros con modificación única fue de 15,1 nM. Por el contrario, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones (mod. doble) analizados que no mostraron unión fue de 44 %. Además, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones con una Kd ≤ 10 nM fue de 25 %, y la Kd promedio para todos los aptámeros con dos modificaciones fue de 0,7 nM.

Tabla 13. Resumen de los datos de unión de los aptámeros con modificación única y doble para ERBB3

Diana de ERBB3						
Categoría	Modificación en la posición 5 del aptámero	% de aptámeros analizados con una Kd $\leq 10$ nM	N.º total de aptámeros analizados	Kd de aptámero con mayor afinidad por la diana	N.º total de aptámeros sin unión	% de aptámeros sin unión
Control (sin modificar)	dC/dT	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Mod. única	NapdC/dT	75 %	28	0,035 nM	5	18 %
	PPdC/dT	0 %	12	17,5 nM	3	25 %
	dC/NapdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	dC/PPdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	dC/MOEdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	dC/TyrdU	17 %	23	0,35 nM	16	70 %
	dC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Dos mod.	NapdC/NapdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	NapdC/PPdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	NapdC/MOEdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	NapdC/TyrdU	69 %	39	0,02 nM	10	26 %
	NapdC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/PPdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/NapdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/MOEdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	PPdC/TyrdU	69 %	35	0,02 nM	8	23 %
	PPdC/ThrdU	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

Basándose en la información en la tabla 13, el porcentaje de todos los aptámeros con modificación única analizados que no mostraron unión fue del 38 %. La falta de unión se define como un aptámero que tiene una Kd de 320 nM o superior. El porcentaje de todos los aptámeros con única modificación con una Kd  $\leq 10$  nM fue del 40 %, y la Kd promedio de todos los aptámeros con modificación única fue de 6 nM. Por el contrario, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones (mod. doble) analizados que no mostraron unión fue de 24 %. Además, el porcentaje de todos los aptámeros con dos modificaciones con una Kd  $\leq 10$  nM fue de 69 %, y la Kd promedio para todos los aptámeros con dos modificaciones fue de 0,02 nM.

#### Ejemplo 7: Otros aptámeros que comprenden dos bases modificadas

Las bibliotecas que comprenden cada uno de los pares de modificación mostrados en la Tabla 14 se realizan de la siguiente manera. En algunas realizaciones, cada biblioteca contiene 40 o más nucleótidos seleccionados al azar. En algunas realizaciones, cada biblioteca contiene 30 nucleótidos seleccionados al azar, permitiendo  $\geq 10^{15}$  secuencias diferentes. Las bibliotecas pueden ser sintetizadas enzimáticamente usando trifosfatos de nucleótidos naturales y/o modificados usando ADN polimerasa KOD, Exo-. En algunas realizaciones, la región aleatoria está flanqueada por secuencias fijas para hibridar los cebadores de amplificación por PCR, con o sin espaciadores adicionales en el extremo 5' y en el extremo 3'. En algunos casos, el molde sintético maestro se usa para generar bibliotecas modificadas con todas las posiciones dU y/o dC uniformemente modificadas en reacciones de extensión de cebadores de sustitución. La síntesis de la biblioteca puede realizarse sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Tabla 14: Bibliotecas de aptámero con modificación doble

Biblioteca	
1	dC/dT (control de ADN)
2	Nap-dC/dT
3	2Nap-dC/dT
4	PP-dC/dT
5	Tyr-dC/dT
6	dC/Nap-dU
7	dC/2Nap-dU
8	dC/PPdU
9	dC/Trp-dU
10	dC/Tyr-dU
11	Nap-dC/Nap-dU
12	Nap-dC/2Nap-dU
13	Nap-dC/PP-dU
14	Nap-dC/Trp-dU
15	Nap-dC/Tyr-dU
16	2Nap-dC/Nap-dU
17	2Nap-dC/2Nap-dU
18	2Nap-dC/PP-dU
19	2Nap-dC/Trp-dU
20	2Nap-dC/Tyr-dU
21	PP-dC/Nap-dU
22	PP-dC/2Nap-dU
23	PP-dC/PP-dU
24	PP-dC/Trp-dU
25	PP-dC/Tyr-dU
26	Tyr-dC/Nap-dU
27	Tyr-dC/2Nap-dU
28	Tyr-dC/PP-dU
29	Tyr-dC/Trp-dU
30	Tyr-dC/Tyr-dU

Una o varias de las bibliotecas de la Tabla 14 pueden usarse para seleccionar aptámeros que se unan a una diana, tal como una proteína diana. Las bibliotecas que comprenden dos bases modificadas suelen producir aptámeros que tienen mayor especificidad y/o afinidad por la diana.

#### Ejemplo 8: Aptámeros con modificación doble ilustrativos

Los aptámeros de unión a PCSK9 de la familia de secuencia conservada del grupo 11720 (Nap-dC/dT) se muestran en la Tabla 15. Solo se muestra la región aleatoria de cada secuencia. Se indica el número de copias de cada secuencia (idéntica o equivalente con hasta 5 apareamientos incorrectos) de un total de 11.380 secuencias. Todos los aptámeros de esta familia comparten el elemento de secuencia conservado TTppGGpp, donde p = Nap-dC. El aptámero 11730-6 (SEQ ID NO: 4, Kd = 0,1 nM) fue el representante seleccionado de este conjunto para el ensayo

## ES 3 013 534 T3

de estabilidad metabólica.

Tabla 15: Aptámeros del grupo 11720

SEQ ID NO	Copias	Secuencia de región aleatoria
4	401	AAG TTppGGpp GppTpGGGGTpppTGppAA
5	21	ATAppTGGA TTppGGpp ATTTGpGpAGTT
6	4	TGAAG TTppGGpp GTGpGpATGGTApppAT
7	3	TTTGTGp TTppGGpp TAGpGpAGATATppT
8	1	ATAGG TTppGGpp TTGpGpTGTTTAGApA
9	1	TAGATGppTGGTAT TTppGGpp TTGpGpAT
10	2	TAGTGpppTGATpTA TTppGGpp AAGpppA
11	3	TTTGppppTGGTTApG TTppGGpp TGGpGpA
12	2	ATGppG TTppGGpp TAGpGpTpGTTApppA
13	1	TGAppAppTGTppAA TTppGGpp TAGpGpA
14	1	TAppAGGTA TTppGGpp GAGpGpTGpTATA
15	1	GAGpppAGTTAp TTppGGpp TTGpATTGTA
16	1	AAGAGT TTppGGpp TAppGpATTpApppT
17	1	ApAGTpppApAGTTTAA TTppGGpp GTAGppGpT
18	1	ATAppAGGGTpG TTppGGpp AAGpGpTGTT
19	1	GAG TTppGGpp TAGp GpAGAAGpppT GGAT
20	1	TTTTppAGGAA TTppGGpp AAGpGpTGTA
21	1	AATTAppTGAGGA TTppGGpp AAGpGpAGA
22	1	pTGpGTTApGpp TTppGGpp TGGpTGATAG
23	1	TAppTGAGTTATGTA TTppGGpp GTGpGpA
24	1	pAAAGpA TTppGGpp TTGpGpAGTAGpppT
25	1	GTAGTTppAGATTGA TTppGGpp TTGpGpT
26	1	AATApTppAGGTGAG TTppGGpp AAGpGpT

- 5 Los aptámeros de unión a PCSK9 de la familia de secuencia conservada de grupo 11730 (Nap-dC/Tyr-dU) se muestran en la Tabla 16. Solo se muestra la región aleatoria de cada secuencia. Se indica el número de copias de cada secuencia (idéntica o equivalente con hasta 5 apareamientos incorrectos) de un total de 17.695 secuencias. Todos los aptámeros de esta familia comparten el elemento de secuencia conservado yGpppG, donde p = Nap-dC e Y = Tyr-dU. Muchas secuencias también contenían el elemento de secuencia conservado yyAyGpAp. El aptámero 11730-19 (SEQ ID NO: 27, Kd = 0,2 nM) fue el representante seleccionado de este conjunto para el ensayo de estabilidad metabólica.
- 10

Tabla 16: Aptámeros del grupo 11730

SEQ ID NO	Copias	Secuencia de región aleatoria
27	680	GyyAypGpAAyGyGpGpppGGG yGpppG pp
28	163	yG yGpppG GAYyyyAApyGyyppGAGpAGy
29	56	yGyyyAyGpApA yGpppG pGAYGApAGyAA
30	44	AGyGyGAYyAyGpApy yGpppG pAyyyGGy

ES 3 013 534 T3

(continuación)

SEQ ID NO	Copias	Secuencia de región aleatoria
31	15	yAyAGAApAyAAyGpApA yGpppG pAyApy
32	15	yAypAGyyyAyGpApG yGpppG pGAYGApY
33	13	GApYApGAGGGAYGAYGpApA yGpppG pAy
34	11	AyAAyGAYyAyGpApA yGpppG pAyGypAy
35	4	GGpAypGyG yGpppG AyyyyyAApGGGA
36	4	GppGAAyyyAyGpApp yGpppG pAyGAYyp
37	2	ppAAypAyGApApA yGpppG GAYGAYApY
38	1	yApGA yGpppG GAYyyGApYgyppGypG
39	1	pGyAGpGApGGGpGyGGpA yGpppG Gppppp
40	1	yGGyGAGAG yGpppG GAYyyAApyGyypp
41	1	ypAAAGGppGyG yGpppG AyyyyyAApPG
42	1	yyyyGAAGyyGAG pGyGGpAAyApy yGppp
43	1	pGyGyyyAyGpApy yGpppG pGAYyApApp

Los aptámeros de unión a PCSK9 de la familia de secuencia conservada de grupo 11733 (Pp-dC/Nap-dU) se muestran en la Tabla 17. Solo se muestra la región aleatoria de cada secuencia. Se indica el número de copias de cada secuencia (idéntica o equivalente con hasta 5 apareamientos incorrectos) de un total de 16.118 secuencias. Todos los aptámeros de esta familia comparten el elemento de secuencia conservado rPPAAGGrrPAPPG (SEQ ID NO: 83), donde r = Pp-dC y P = Nap-dU. El aptámero 11733-44 (SEQ ID NO: 44, SL1063) fue el inhibidor más potente de 30 mer de la PCSK9 de humano de tipo salvaje (CI<sub>50</sub> = 2,8 nM). El aptámero 11733-198 (SEQ ID NO: 46, Kd = 0,07 nM) fue el representante seleccionado de este conjunto para el ensayo de estabilidad metabólica.

5  
10

Tabla 17: aptámeros del grupo 11733

SEQ ID NO	Copias	Secuencia de región aleatoria
44	1041	AArGpA rpppAAGGrrpAppG AGGAAArpr
45	969	rA rpppAAGArrpAppG rGGAGArrpGGG
46	340	rGpG rpppAAGArrpGppG AGApGrGrprA
47	204	A rpppAAGArrpGppG AGGGrrprGGGAAp
48	158	GrrGGp GpppAAGAArpGppG GGGrArppr
49	154	GrGrA rpppAAGArrpAppG GGGAGAArpr
50	127	pppAAGGrrpGppG AGGArrprGGrApGAA
51	105	rAA rpppAAGGrrpGppG GGAGAGrrpppG
52	51	GAApArrArG rpppAAGArrpAppG GAprG
53	23	GAGAA rpppAAGArrpAppG AGGGrrprpG
54	13	rGA rpppAAGGrrpAppG GGGGArprGAR
55	11	GAArA rpppAAGArrpGppG GGAAGrGprp
56	10	A rpppAAGGrrpGppG AGGAAArrGprpGA
57	10	AG rpppAAGArrpGppG AGAApprGARAAA
58	8	AG rpppAAGArrpGppG AGrAGrrprGARr

ES 3 013 534 T3

(continuación)

SEQ ID NO	Copias	Secuencia de región aleatoria
59	7	GAAGGprAAGpGGrA rpppAAGGrrpGppr
60	7	AAArrA rpppAAGArrpGppG GGGrArprp
61	6	AAAr rpppAAGArrpAppG AGGpGGGrprA
62	6	pAGGrG rpppAAGArrpAppG AGGGArpr
63	4	GpGARg rpppAAGArrpAppA GGGrArprp
64	3	GAAArrA rpppAAGArrpAppG AGAGArpr
65	3	GAAA rpppAAGArrpAppG AGrAGGAArpr
67	3	rGA rpppAAGArrpGppG AAAGprGrGGGG
68	3	A rpppAAGArrpGppG AGArrGGprGGArAp
69	2	GAA rpppAAGArrpGppG AGGArrAprArG
70	2	ArGpGGAGprGGArA rpppAAGGrrpGppr
71	2	prGrGA rpppAAGGrrpAppG pGGGArprp
72	2	G rpppAAGGrrpAppG AGAprGGprGGGp
73	2	GA rpppAAGGrrpGppG AAGGprGAGAGpp
74	2	AArGAp rpppAAGGrrpGppA GGGGrprp
75	2	rAAGrpGrrprGrA rpppAAGArGpGppG G
76	2	ArrGp GpppAAGAArpGppG GGGGAArpr
77	1	GAApArrArG rpppAAGArrpAppG AGAprGrGrprA
78	1	pAAGrrpGAGAAArrA rpppAAGArrpppp
79	1	rGAA rpppAAGArrpGppG AGrAGprppr
80	1	AGAAp rpppAAGGrrpGprG AGArrprGAG

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que comprende al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5, en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes;
- 5
- en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5; o
- 10 en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 es una citidina modificada en la posición 5 y en donde la segunda pirimidina modificada en la posición 5 es una uridina modificada en la posición 5;
- en donde la uridina modificada en la posición 5 comprende un resto tiosilo en la posición 5;
- y en donde la citidina modificada en la posición 5 comprende un resto bencilo en la posición 5.
- 15 2. El aptámero de la reivindicación 1, en donde la citidina modificada en la posición 5 es PPdC; en donde la uridina modificada en la posición 5 es una TyrDU.
3. El aptámero de la reivindicación 1, en donde al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 es una PPdC y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5 una TyrDU.
- 20 4. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el aptámero comprende una región en el extremo 5' del aptámero que tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos, en donde la región en el extremo 5' del aptámero carece de pirimidinas modificadas en la posición 5; y en donde el aptámero comprende una
- 25 región en el extremo 3' del aptámero que tiene una longitud de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos, o una longitud de 5 a 30, 10 a 30, 15 a 30, 5 a 20, o 10 a 20 nucleótidos, en donde la región en el extremo 3' del aptámero carece de pirimidinas modificadas en la posición 5.
- 30 5. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el aptámero tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 80, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 40 a 100, o 40 a 90, o 40 a 80, o 40 a 70, o 40 a 60, o 40 a 50 nucleótidos.
6. Una composición que comprende una pluralidad de aptámeros de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. La composición de la reivindicación 6, en donde cada aptámero comprende una región aleatoria, en donde la región aleatoria tiene una longitud de 20 a 100, o 20 a 90, o 20 a 80, o 20 a 70, o 20 a 60, o 20 a 50, o 20 a 40, o 30 a 100, o 30 a 90, o 30 a 70, o 30 a 60, o 30 a 50, o 30 a 40 nucleótidos.
- 40 8. Una composición que comprende un aptámero y una diana, en donde el aptámero y la diana son capaces de formar un complejo, y en donde el aptámero es un aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Una composición que comprende un primer aptámero, un segundo aptámero y una diana,
- 45 en donde el primer aptámero comprende al menos una primera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una segunda pirimidina modificada en la posición 5;
- en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5 o en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una cuarta pirimidina modificada en la posición 5;
- 50 en donde el primer aptámero, el segundo aptámero y la diana son capaces de formar un complejo trímero; y en donde la primera pirimidina modificada en la posición 5 y la segunda pirimidina modificada en la posición 5 son pirimidinas modificadas en la posición 5 diferentes; y
- en donde el primer aptámero es un aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde la diana se selecciona de una proteína, un péptido, un
- 55 carbohidrato, una molécula pequeña, una célula y un tejido.
11. Un método que comprende:
- 60 (a) poner en contacto un aptámero capaz de unirse a una molécula diana con una muestra;
- (b) incubar el aptámero con la muestra para permitir que se forme un complejo aptámero-diana;
- (c) enriquecer el complejo aptámero-diana en la muestra y
- (c) detectar la presencia del aptámero, del complejo aptámero-diana o de la molécula diana, en donde la detección del aptámero, del complejo aptámero-diana o de la molécula diana indica que la molécula diana está presente en la muestra, y en donde la ausencia de detección del aptámero, del complejo aptámero-diana o de la molécula diana
- 65 indica que la molécula diana no está presente en la muestra;

en donde el aptámero es un aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5 12. El método de la reivindicación 11, en donde el método comprende al menos una etapa adicional seleccionada de: añadir una molécula competidora a la muestra; capturar el complejo aptámero-diana en un soporte sólido; y añadir una molécula competidora y diluir la muestra; en donde la al menos una etapa adicional se produce después de la etapa (a) o la etapa (b); en donde la molécula competidora se selecciona opcionalmente de un oligonucleótido, polidextrano, ADN, heparina y dNTPs; en donde el polidextrano es opcionalmente sulfato de dextrano; en donde el ADN es opcionalmente ADN de esperma de arenque o ADN de esperma de salmón.

10 13. El método de la reivindicación 11 o de la reivindicación 12, en donde la molécula diana se selecciona de una proteína, un péptido, un carbohidrato, una molécula pequeña, una célula y un tejido; y en donde la muestra se selecciona de sangre entera, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, esputo, aire espirado, orina, semen, saliva, líquido meníngeo, líquido amniótico, fluido glandular, fluido linfático, aspirado del pezón, aspirado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, células, un extracto celular, heces, tejido, una biopsia de tejidos  
15 y líquido cefalorraquídeo.

14. Un método para detectar una diana en una muestra que comprende

20 a) poner en contacto la muestra con un primer aptámero para formar una mezcla, en donde el primer aptámero es capaz de unirse a la diana para formar un primer complejo;  
b) incubar la mezcla en condiciones que permitan que se forme el primer complejo;  
c) poner en contacto la mezcla con un segundo aptámero, en donde el segundo aptámero es capaz de unirse al primer complejo para formar un segundo complejo;  
25 d) incubar la mezcla en condiciones que permitan que se forme el segundo complejo;  
e) detectar la presencia o ausencia del primer aptámero, del segundo aptámero, de la diana, del primer complejo o del segundo complejo en la mezcla, en donde la presencia del primer aptámero, del segundo aptámero, de la diana, del primer complejo o del segundo complejo indica que la diana está presente en la muestra;

30 en donde el primer aptámero es un aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;  
en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5, o en donde el segundo aptámero comprende al menos una tercera pirimidina modificada en la posición 5 y al menos una cuarta pirimidina modificada en la posición 5;  
en donde el primer aptámero, el segundo aptámero y la diana son capaces de formar un complejo trímero.

35 15. Un método para identificar uno o más aptámeros capaces de unirse a una molécula diana que comprende:

40 (a) poner en contacto una biblioteca de aptámeros con la molécula diana para formar una mezcla y permitir la formación de un complejo aptámero-diana, en donde el complejo aptámero-diana se forma cuando un aptámero tiene afinidad por la molécula diana;  
(b) separar el complejo aptámero-diana del resto de la mezcla (o enriquecer el complejo aptámero-diana);  
(c) disociar el complejo aptámero-diana; y  
(d) identificar el uno o más aptámeros capaces de unirse a la molécula diana;

45 en donde la biblioteca de aptámeros es la composición de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7.

16. El método de la reivindicación 15, en donde la biblioteca comprende al menos 1000 aptámeros, en donde cada aptámero comprende una secuencia de nucleótidos diferente.

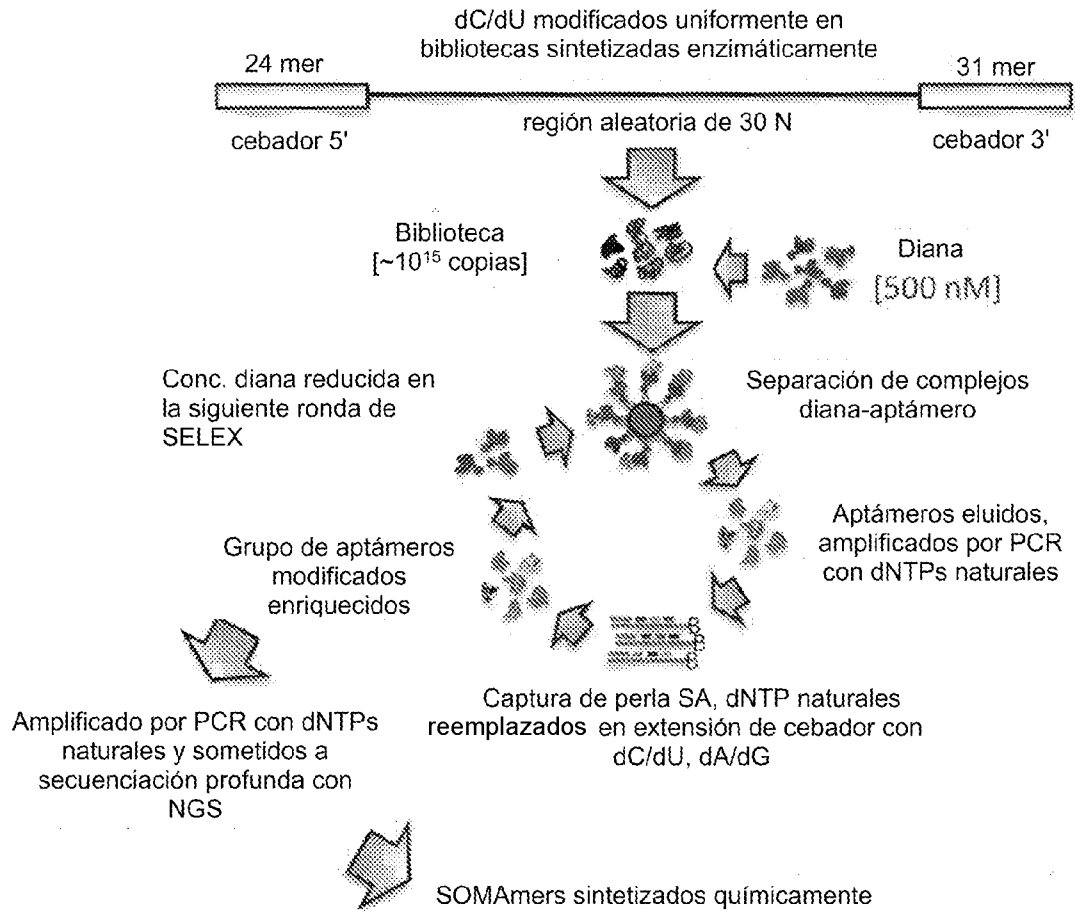


FIG. 1

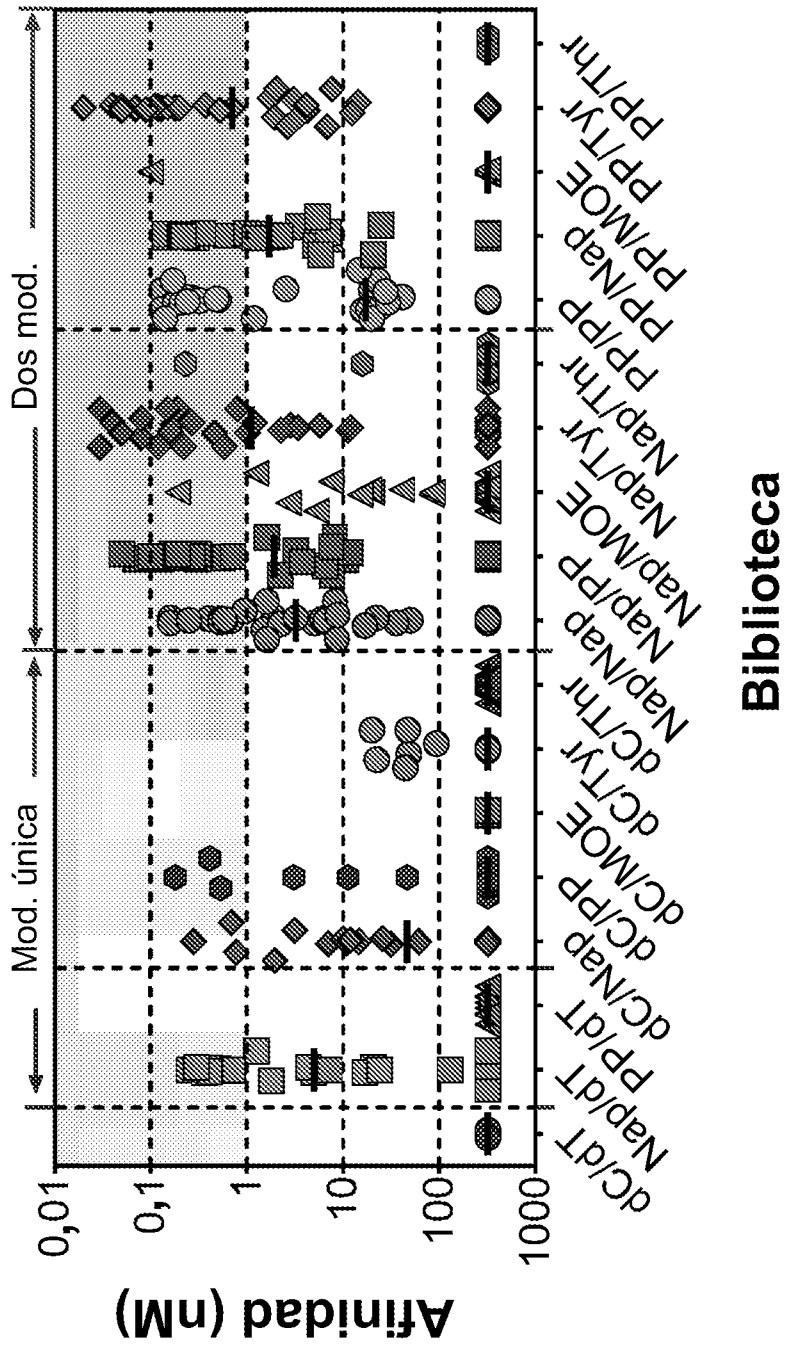


FIG. 2

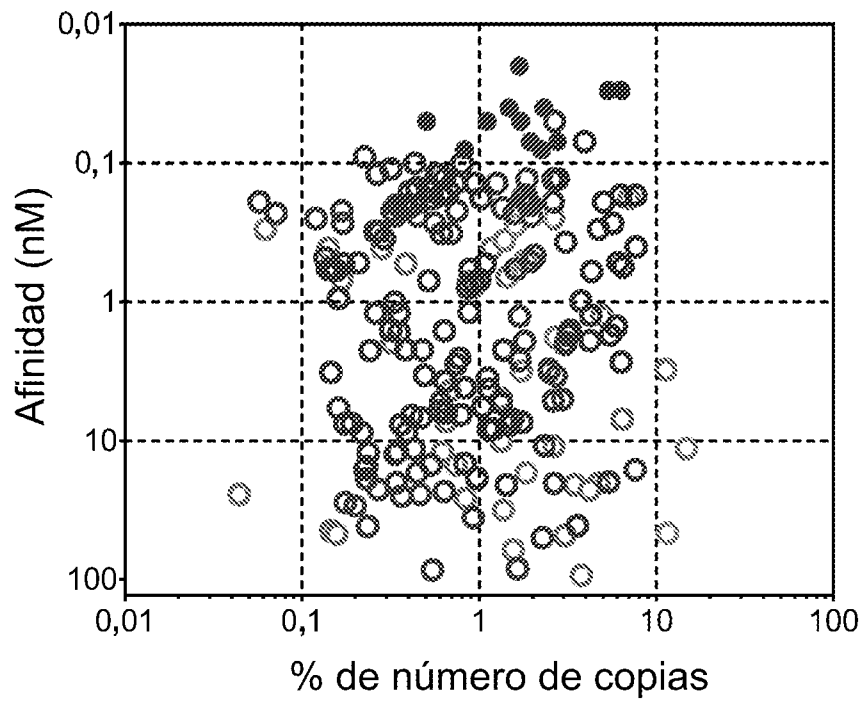


FIG. 3

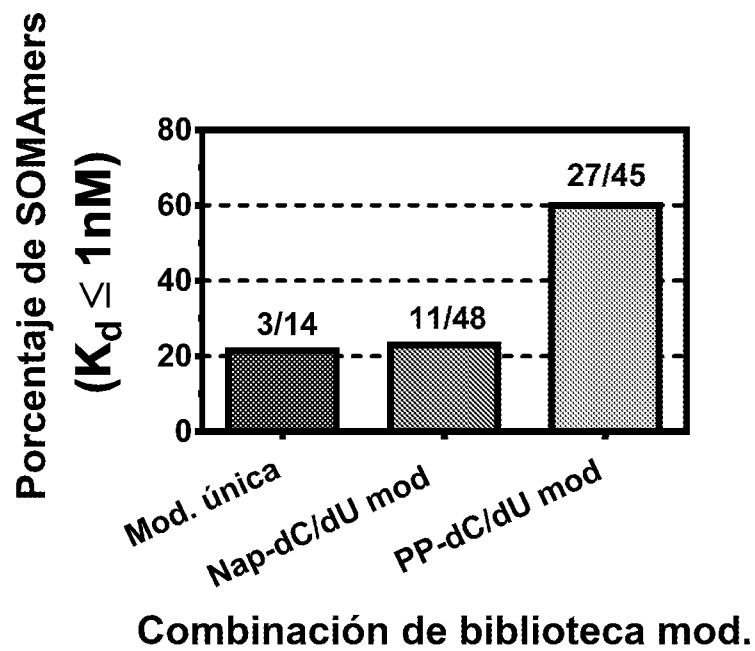


FIG. 4A

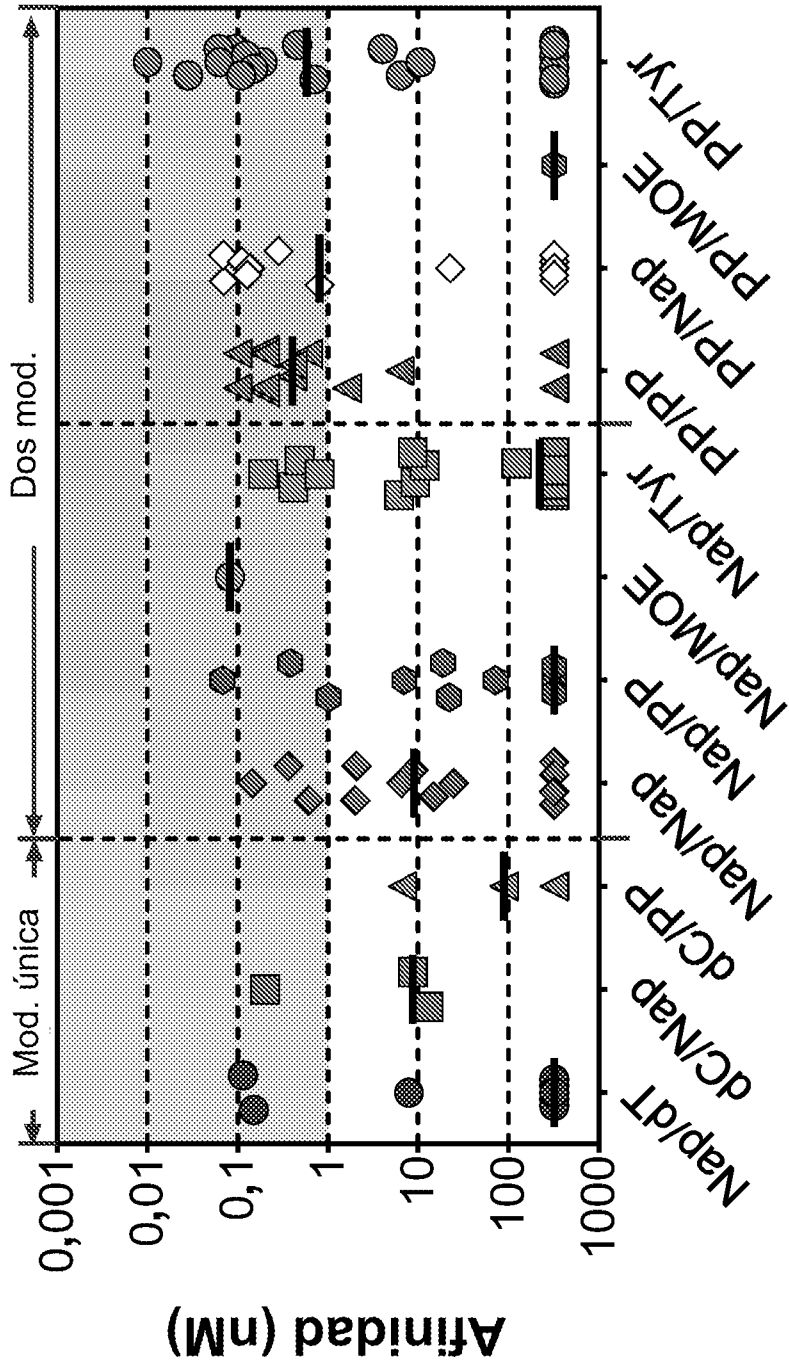


FIG. 4B

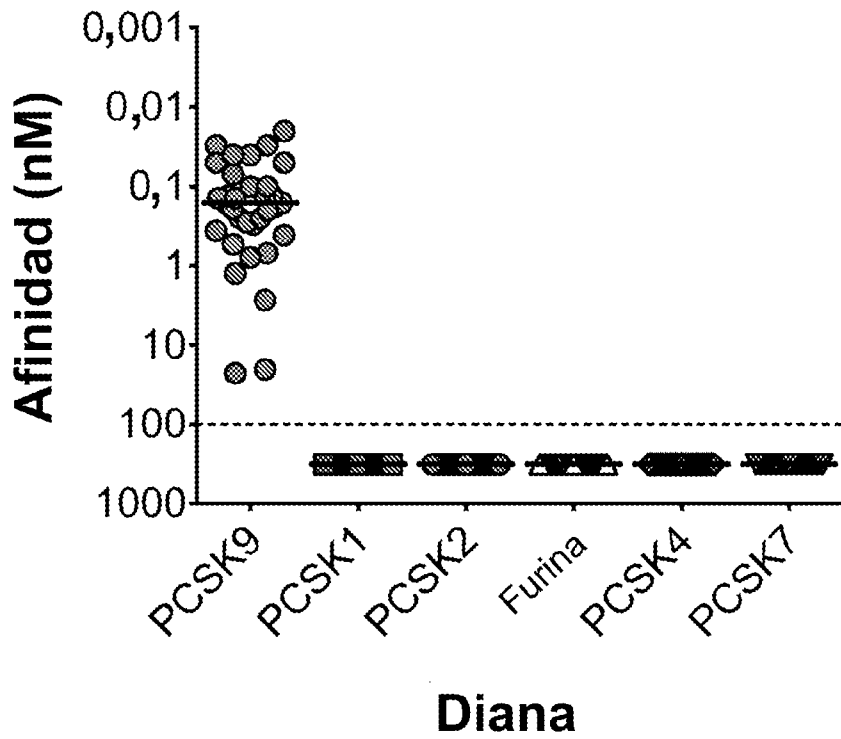


FIG. 5

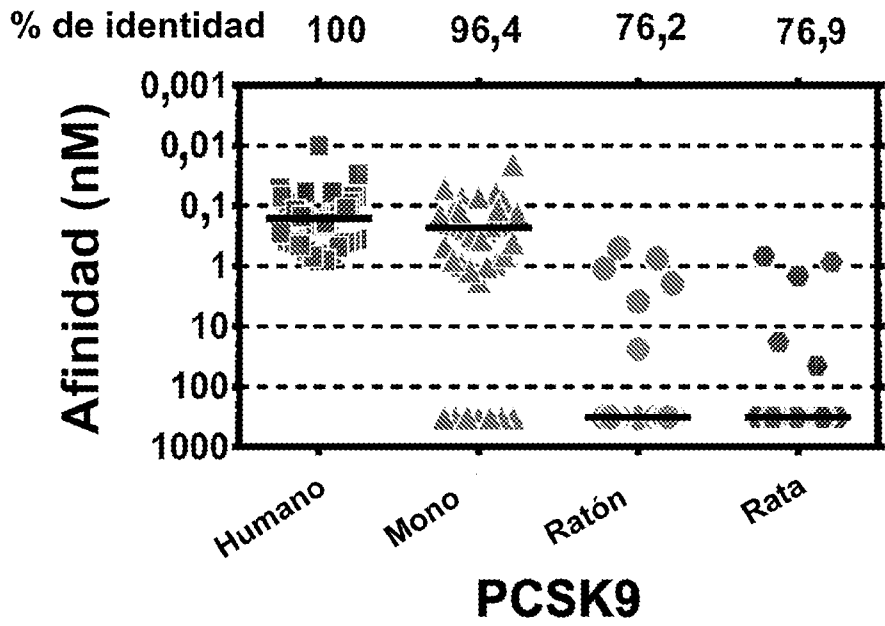


FIG. 6

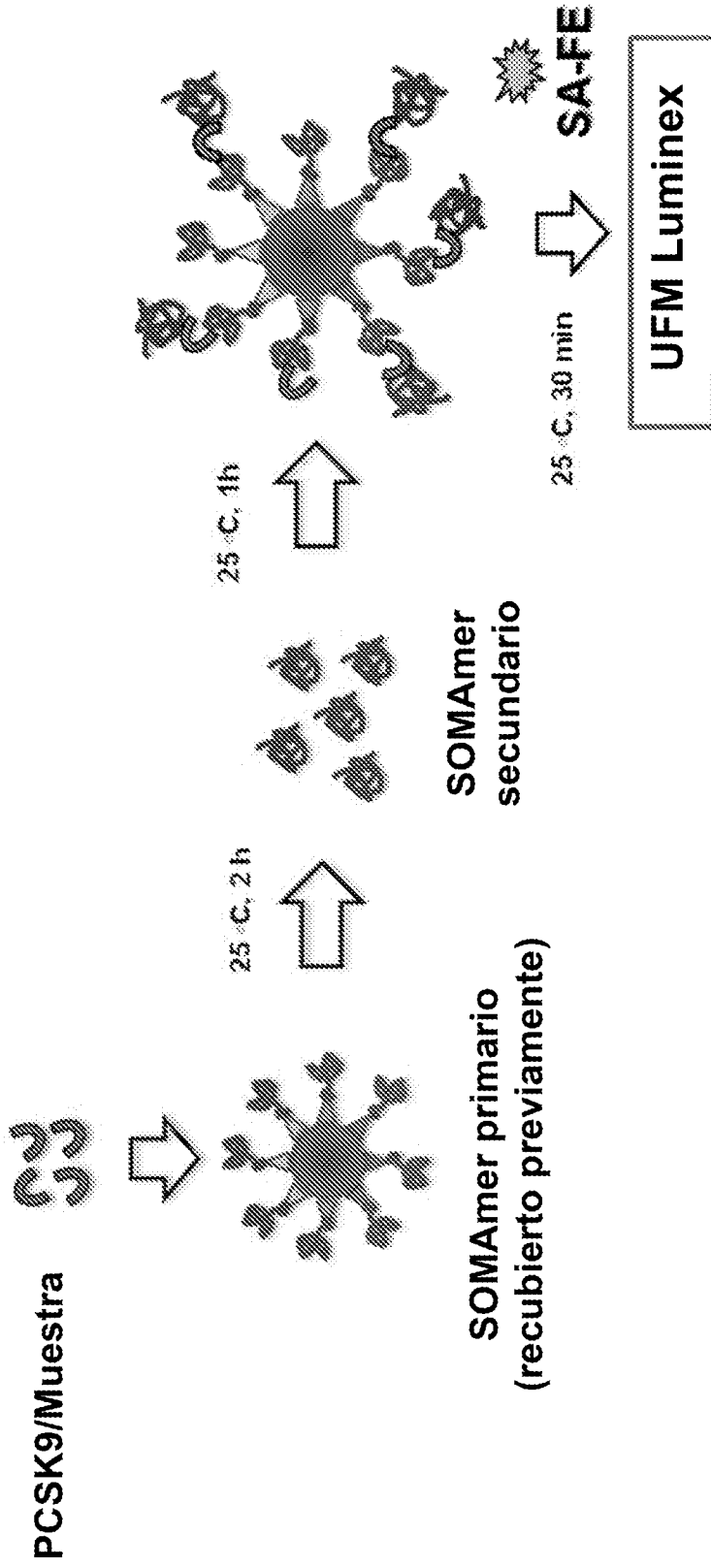


FIG. 7A

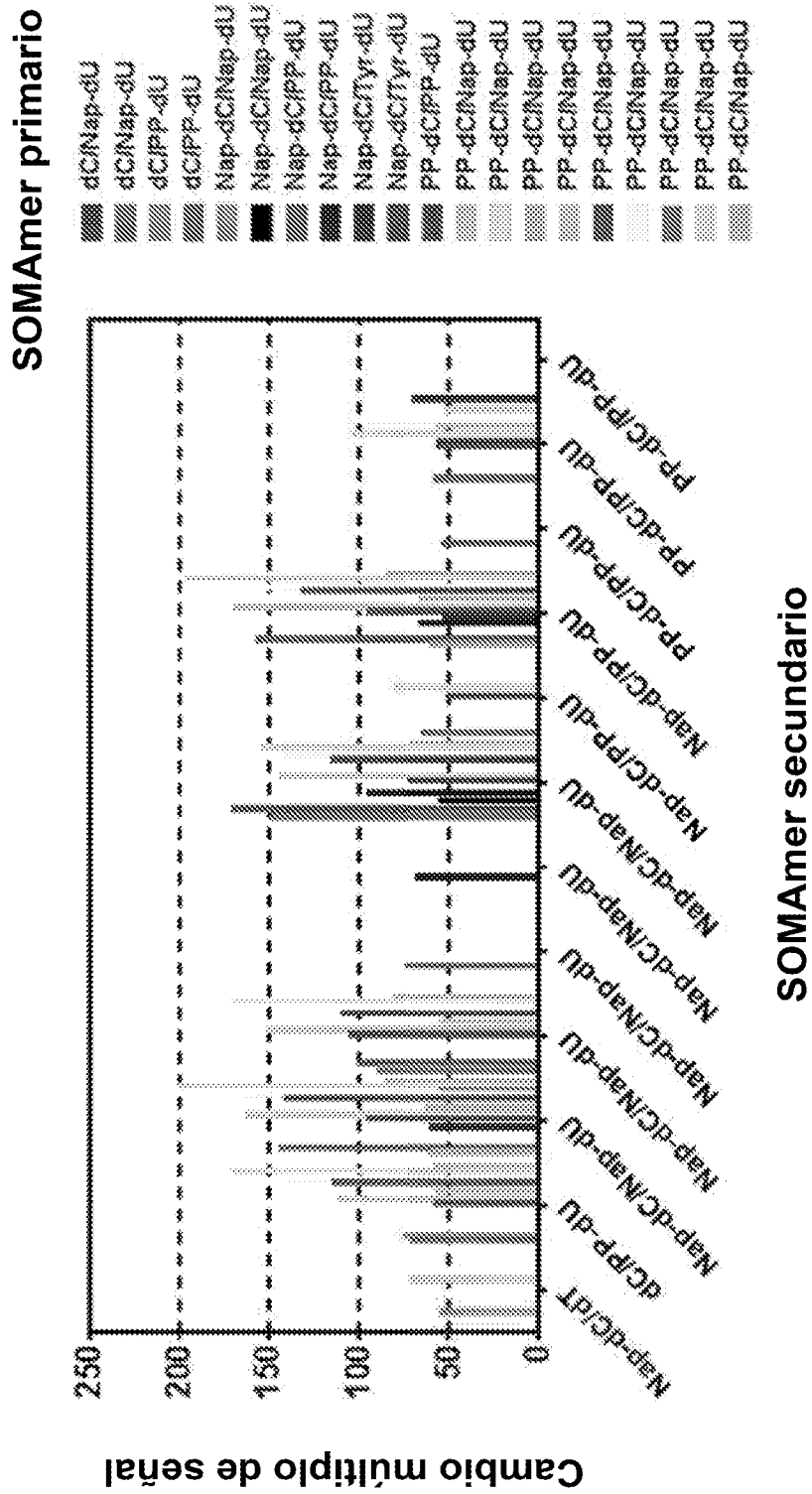
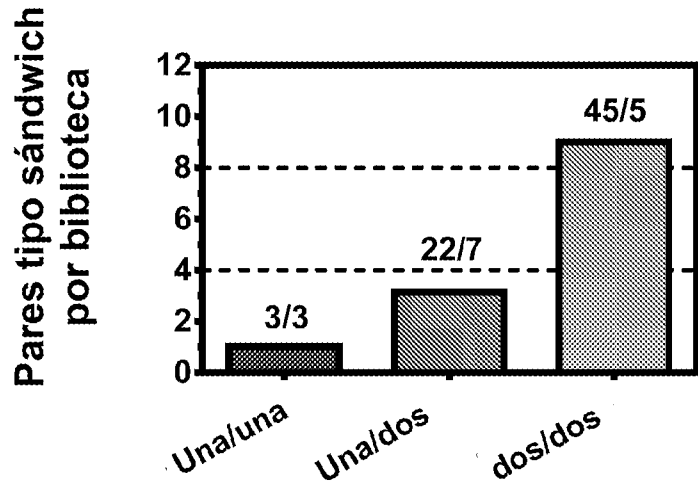


FIG. 7B



Combinación de biblioteca mod.

FIG. 7C

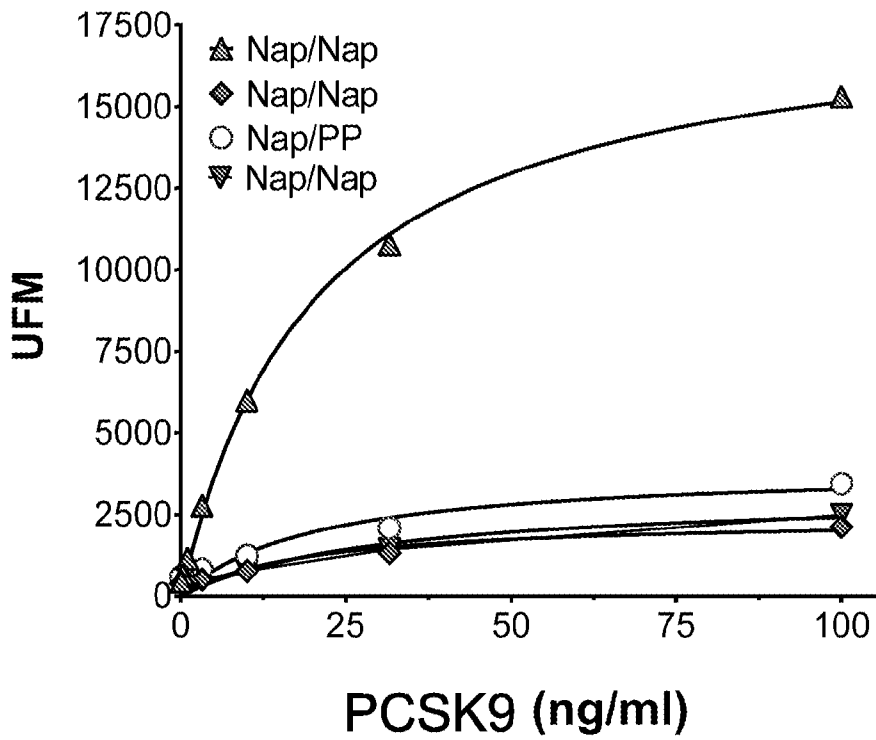


FIG. 8A

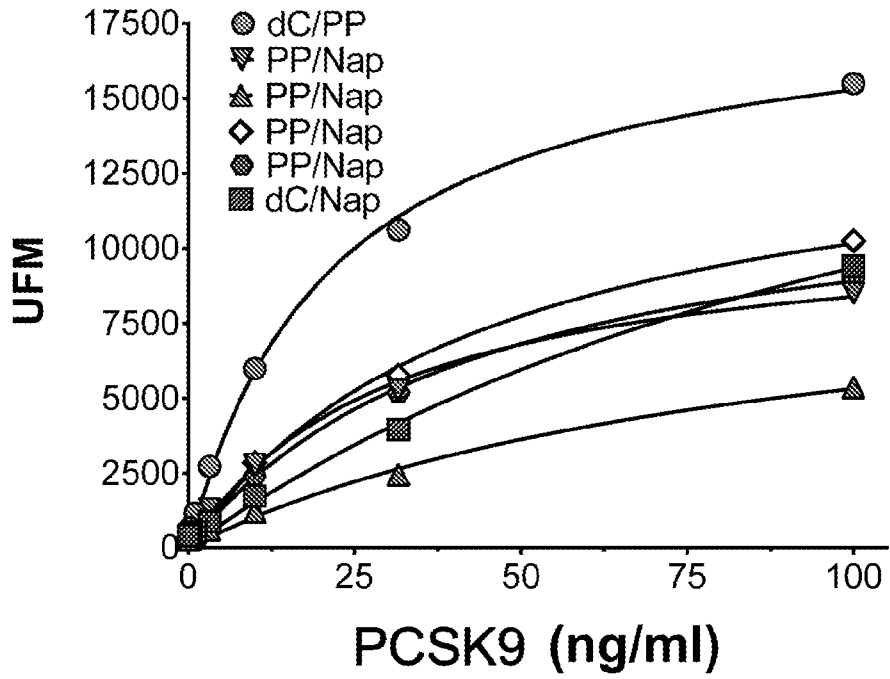


FIG. 8B

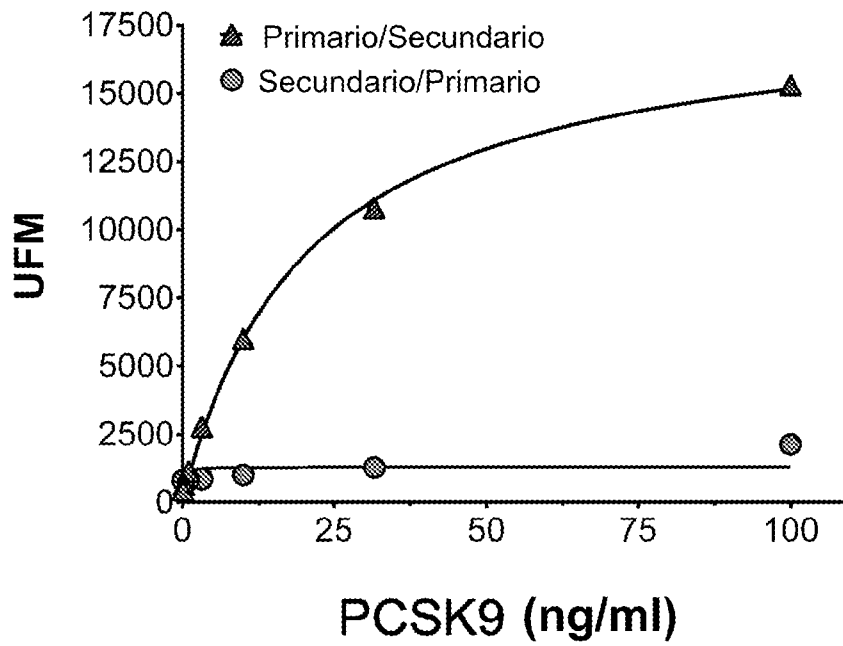


FIG. 8C

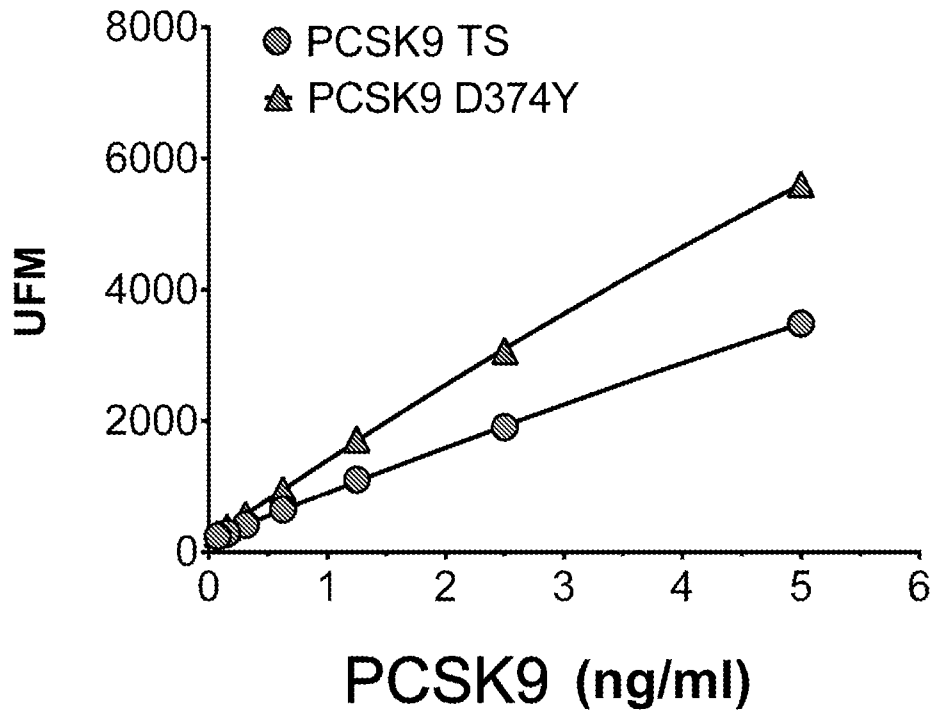


FIG. 8D

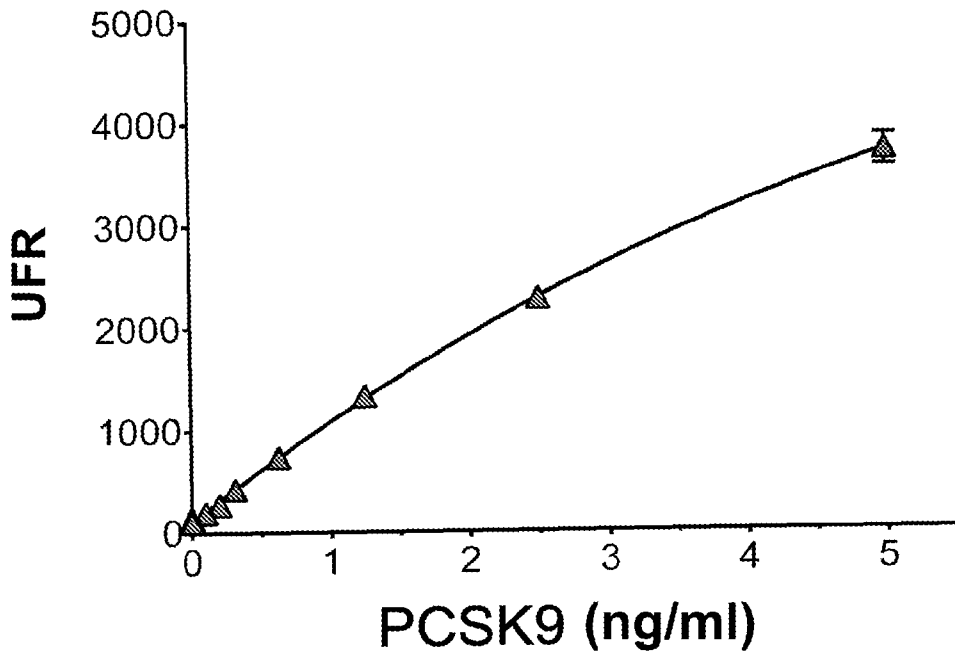


FIG. 9A

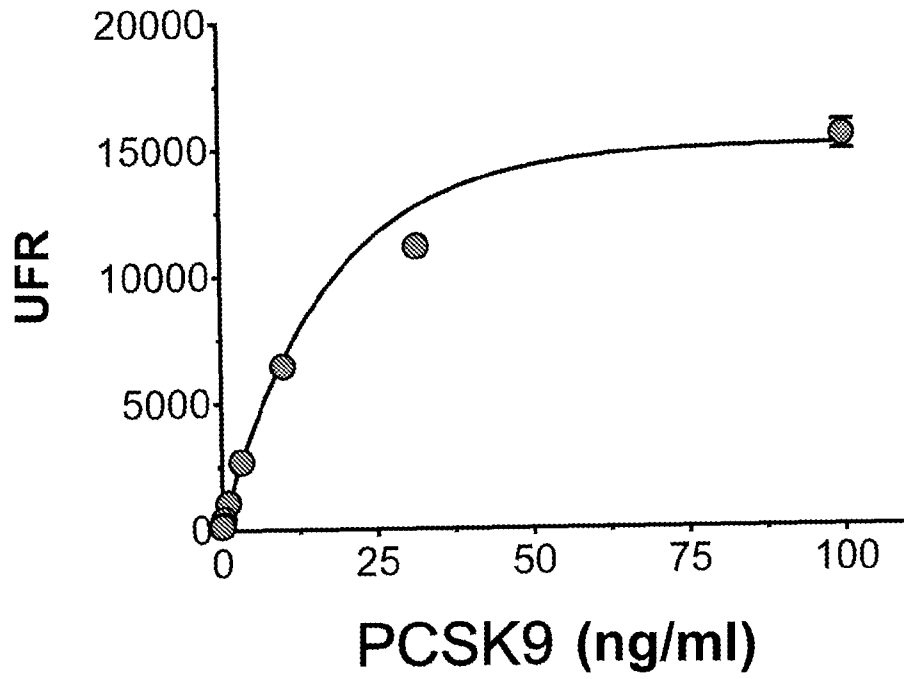


FIG. 9B

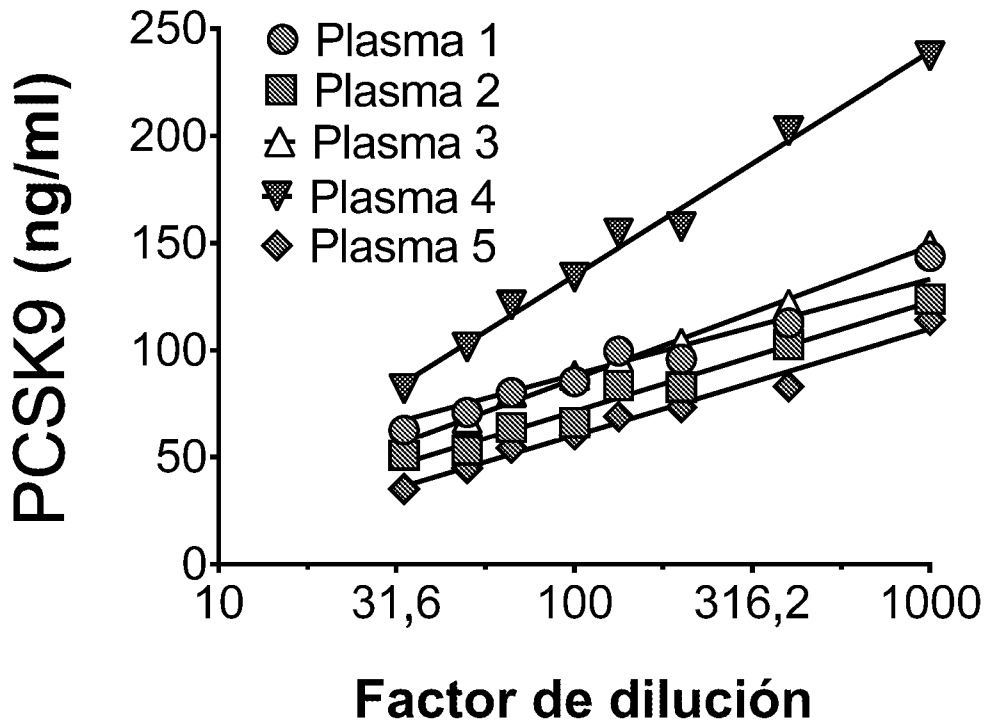


FIG. 10

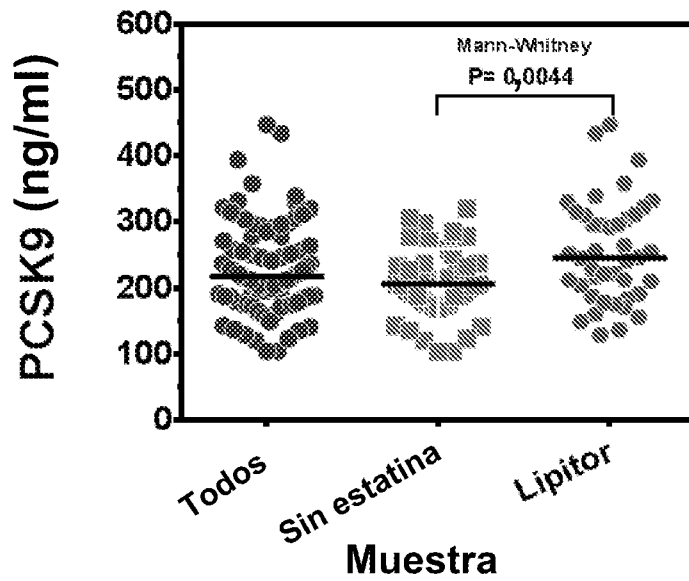


FIG. 11

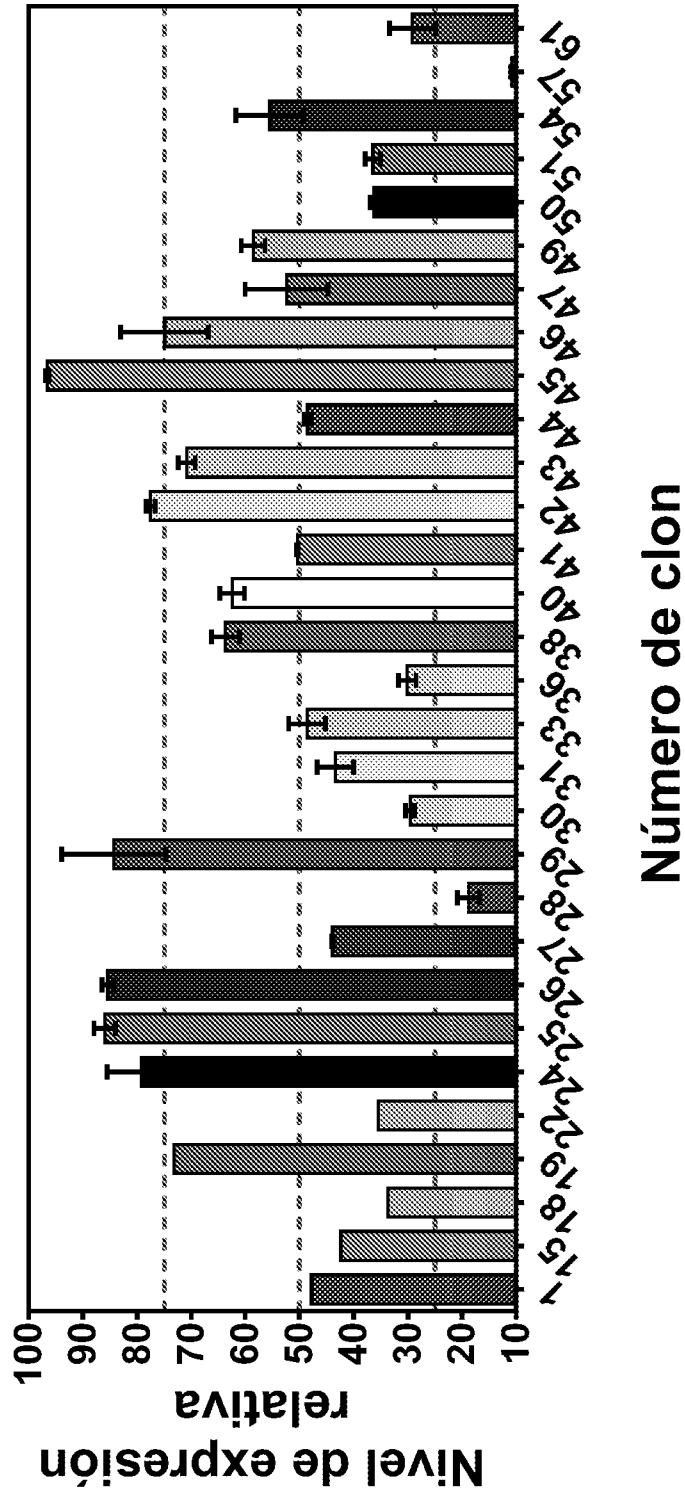


FIG. 12

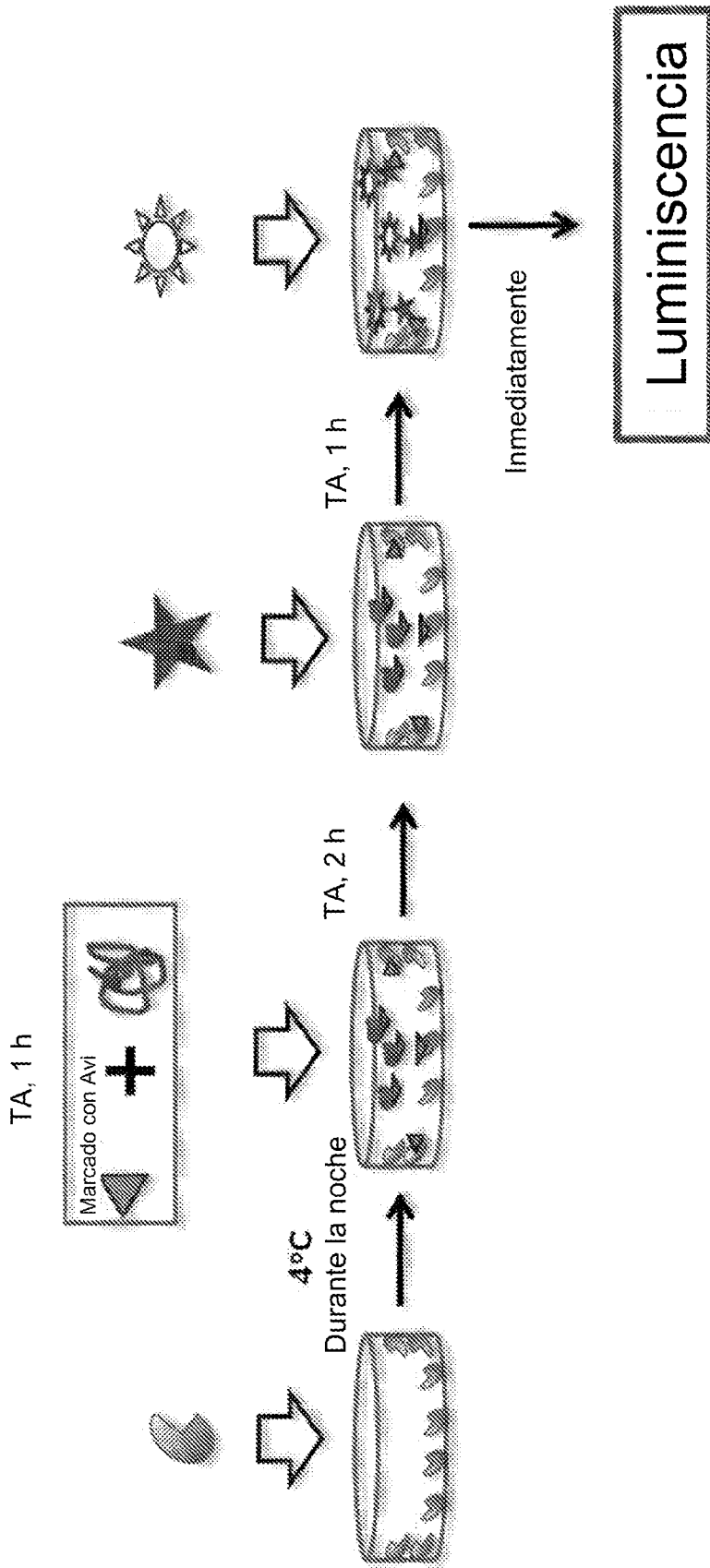


FIG. 13

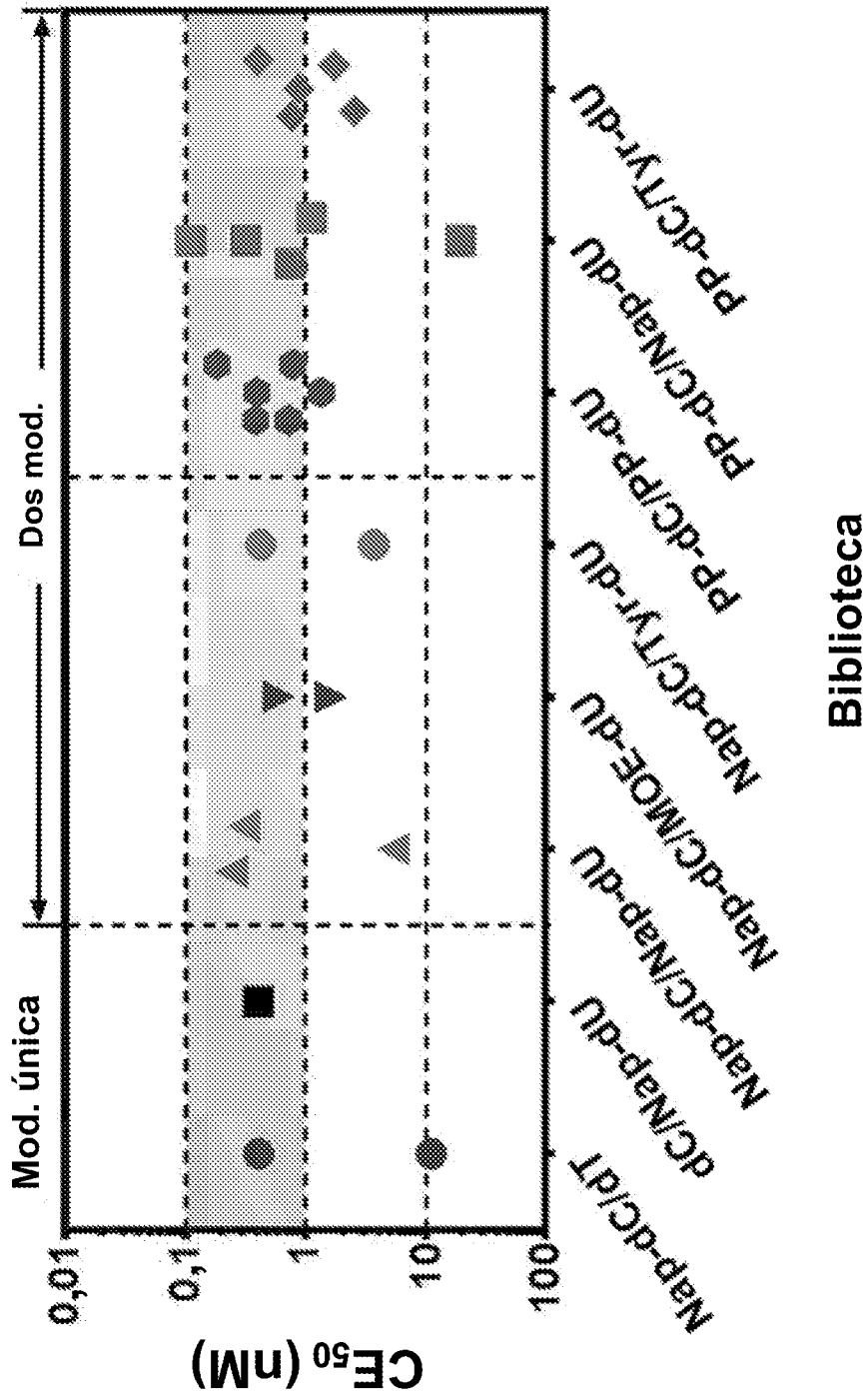


FIG. 14

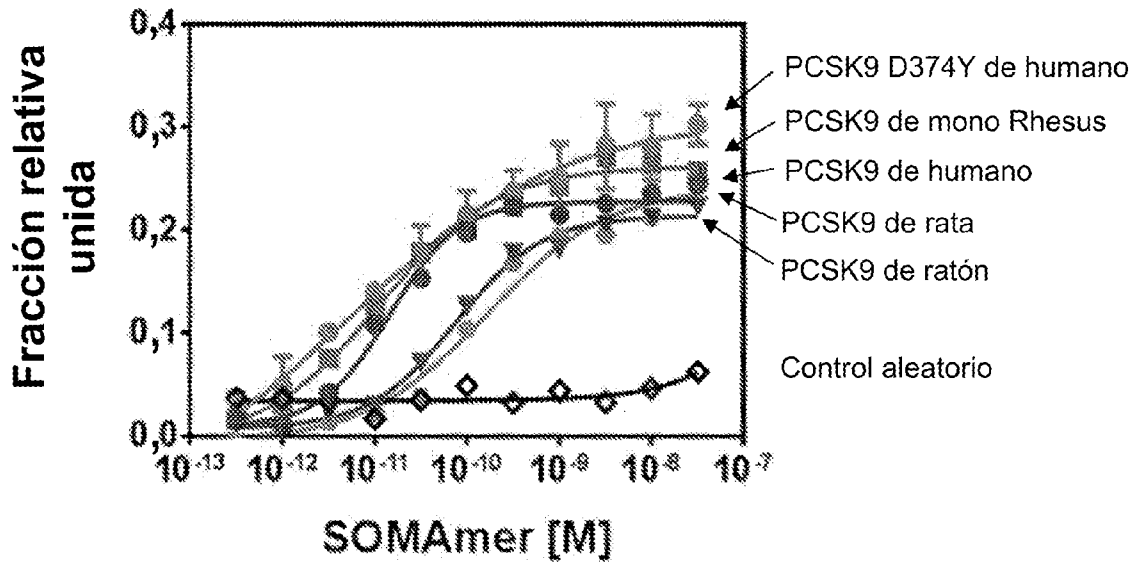


FIG. 15A

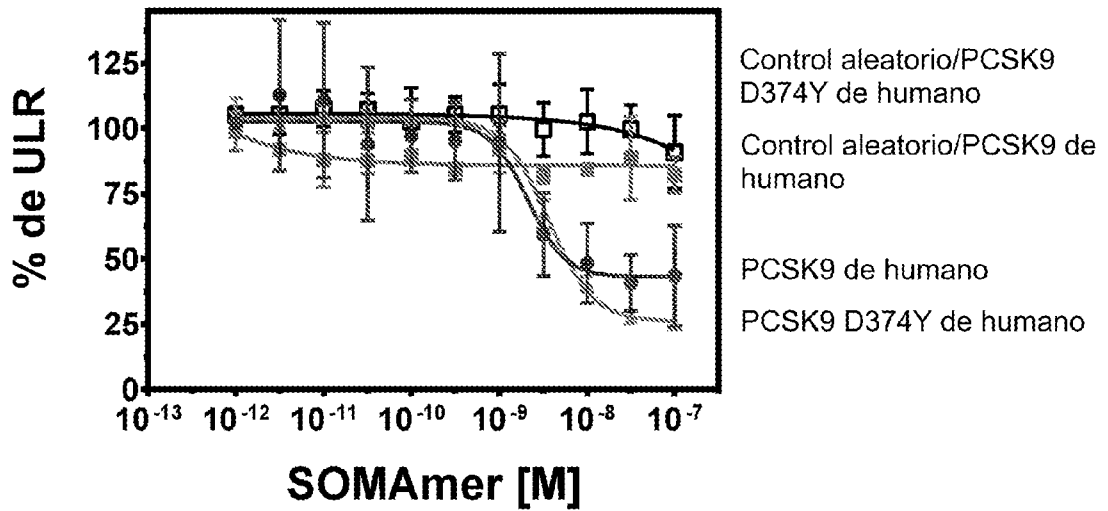


FIG. 15B

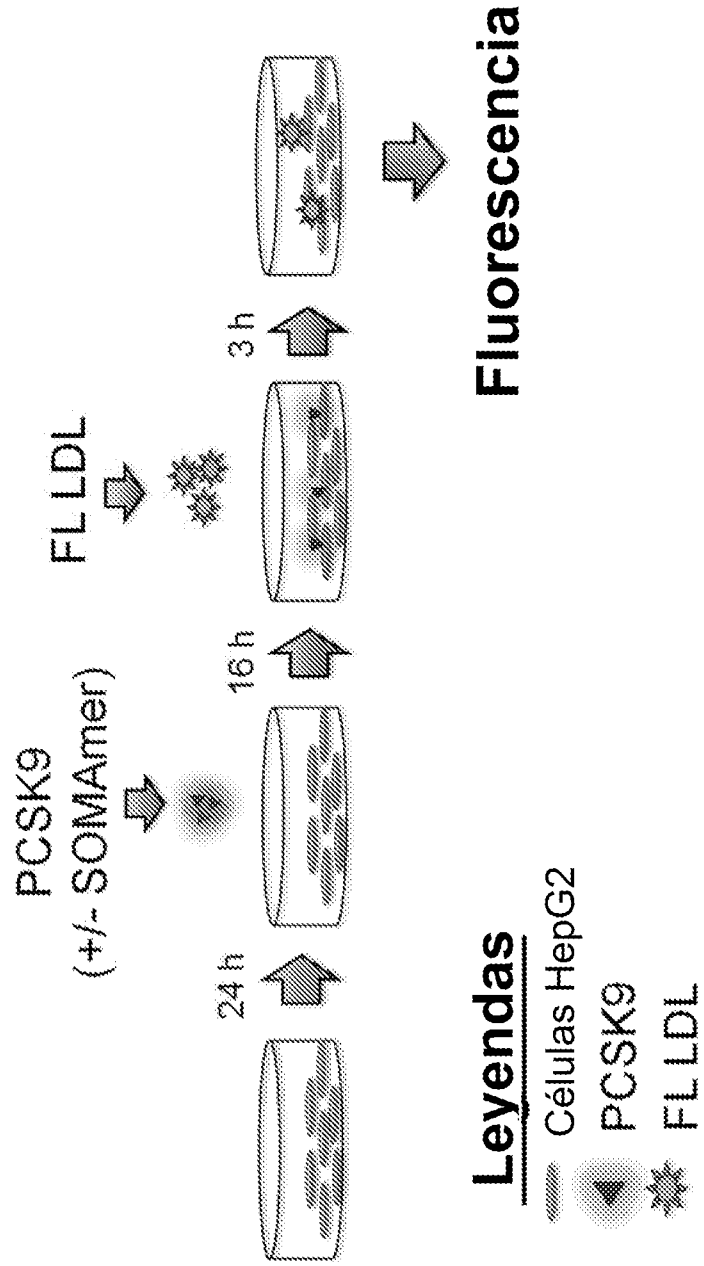


FIG. 16

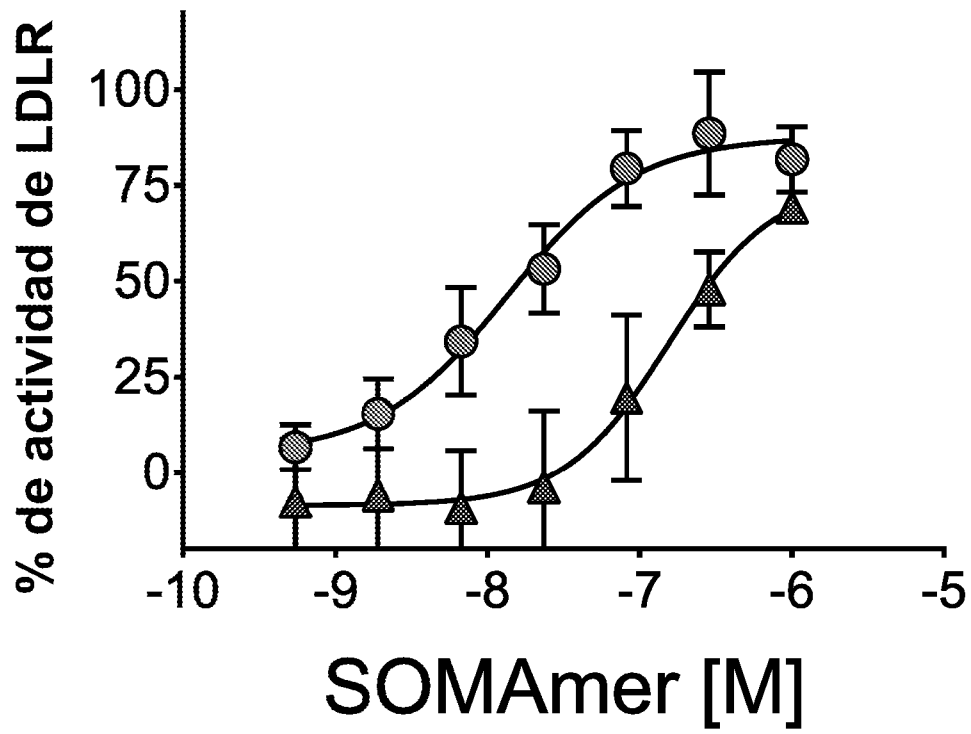


FIG. 17

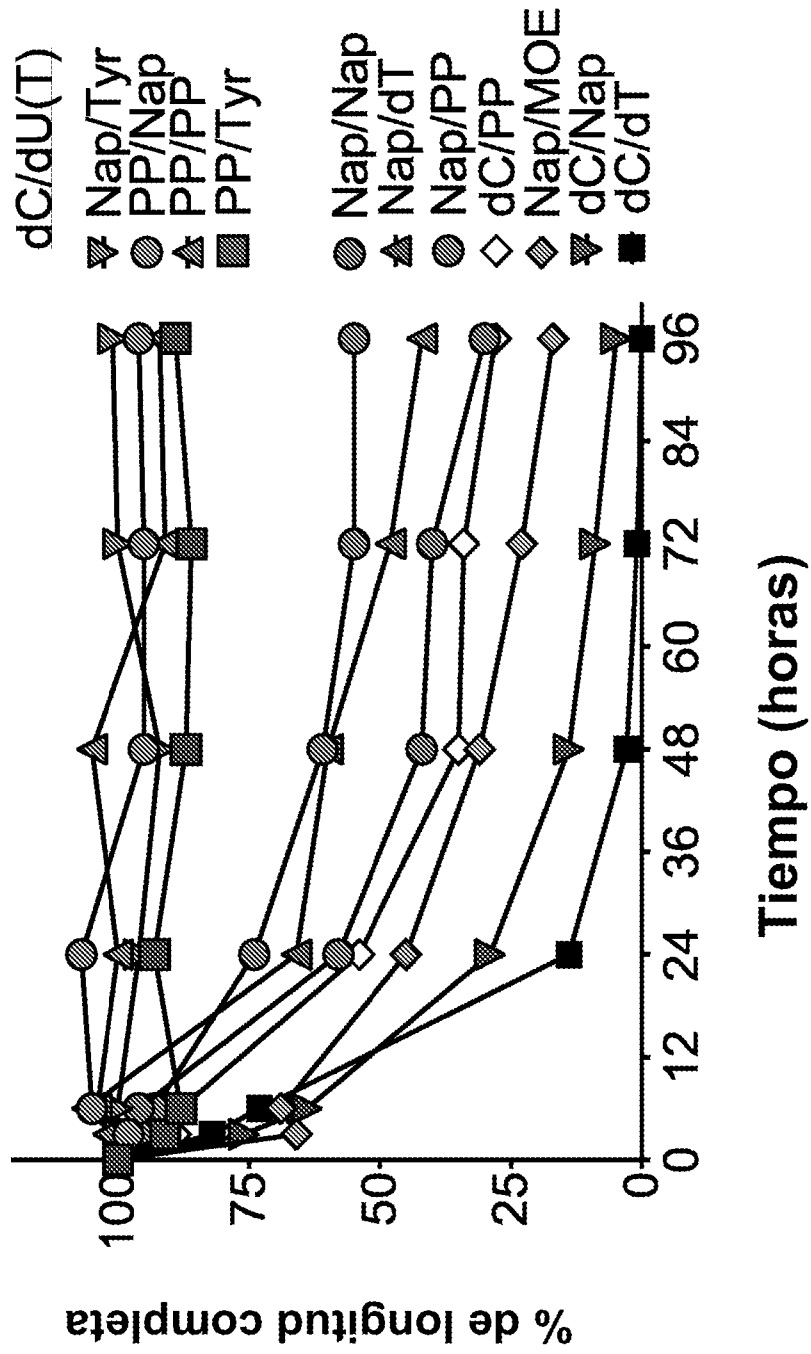
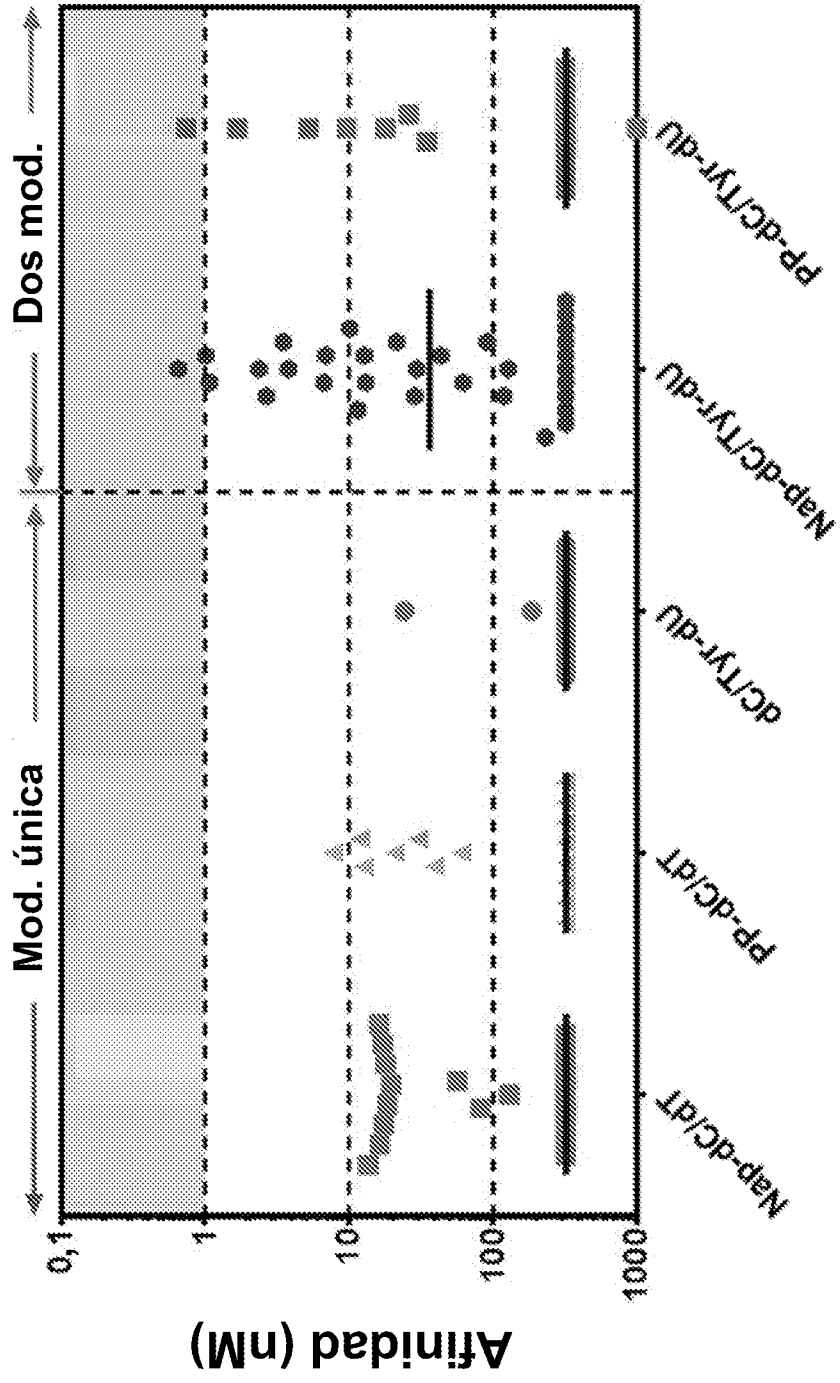
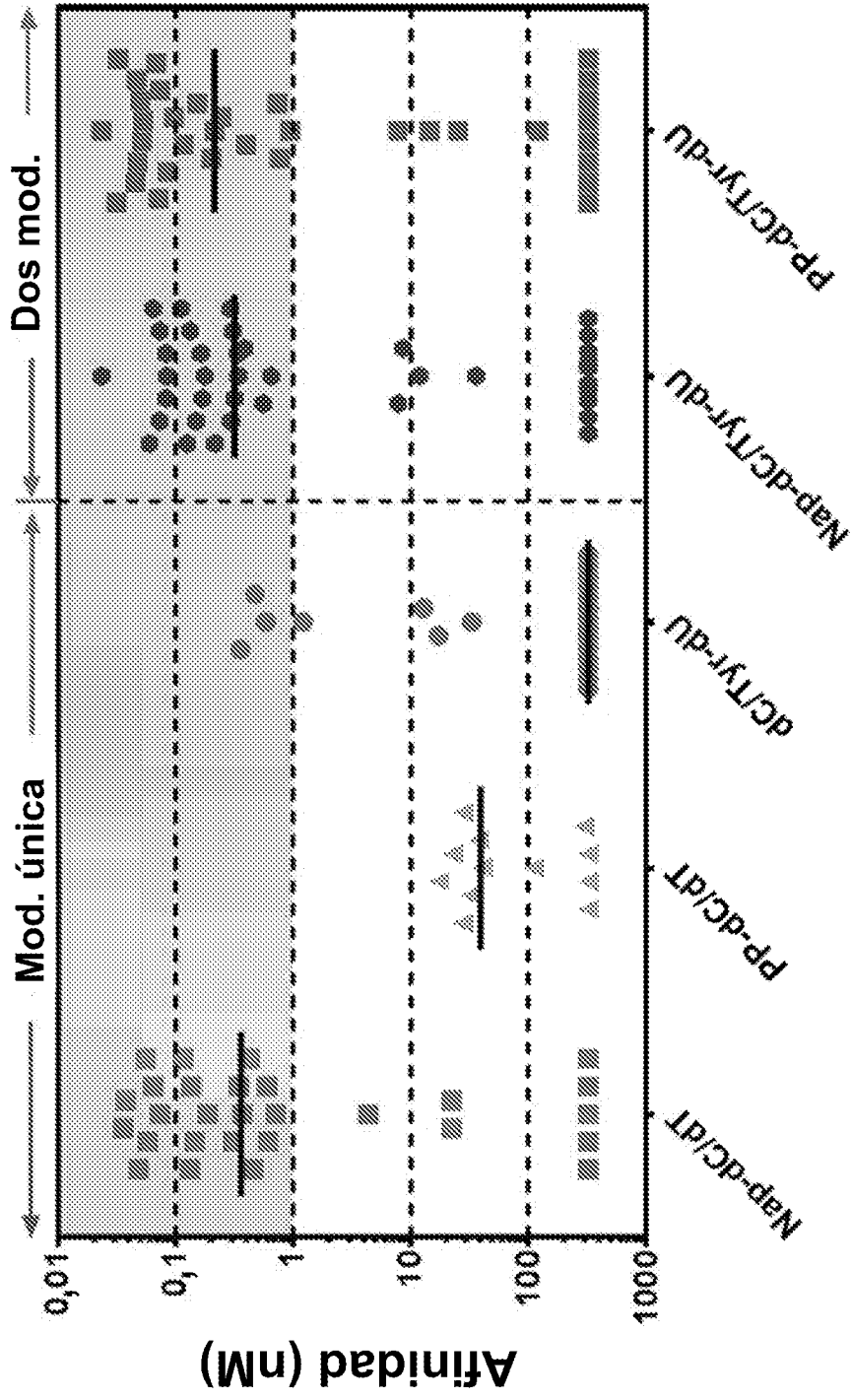


FIG. 18



**Biblioteca**

FIG. 19A



### Biblioteca

FIG. 19B

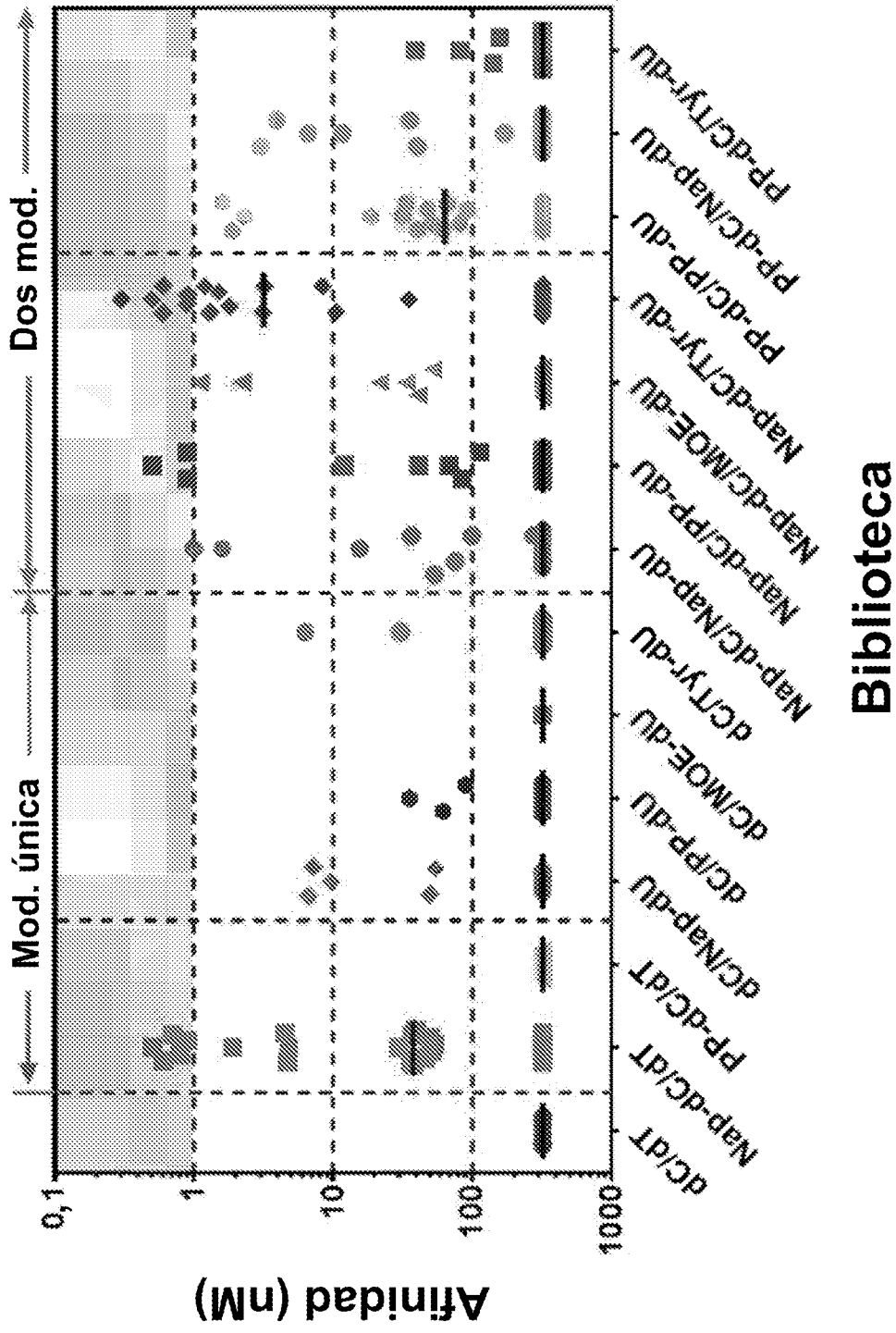
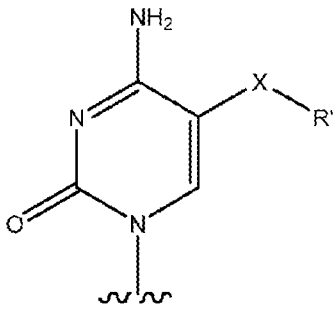
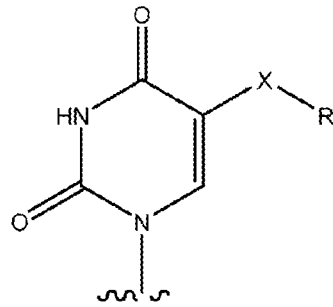


FIG. 19C

CITOSINA



URACILO

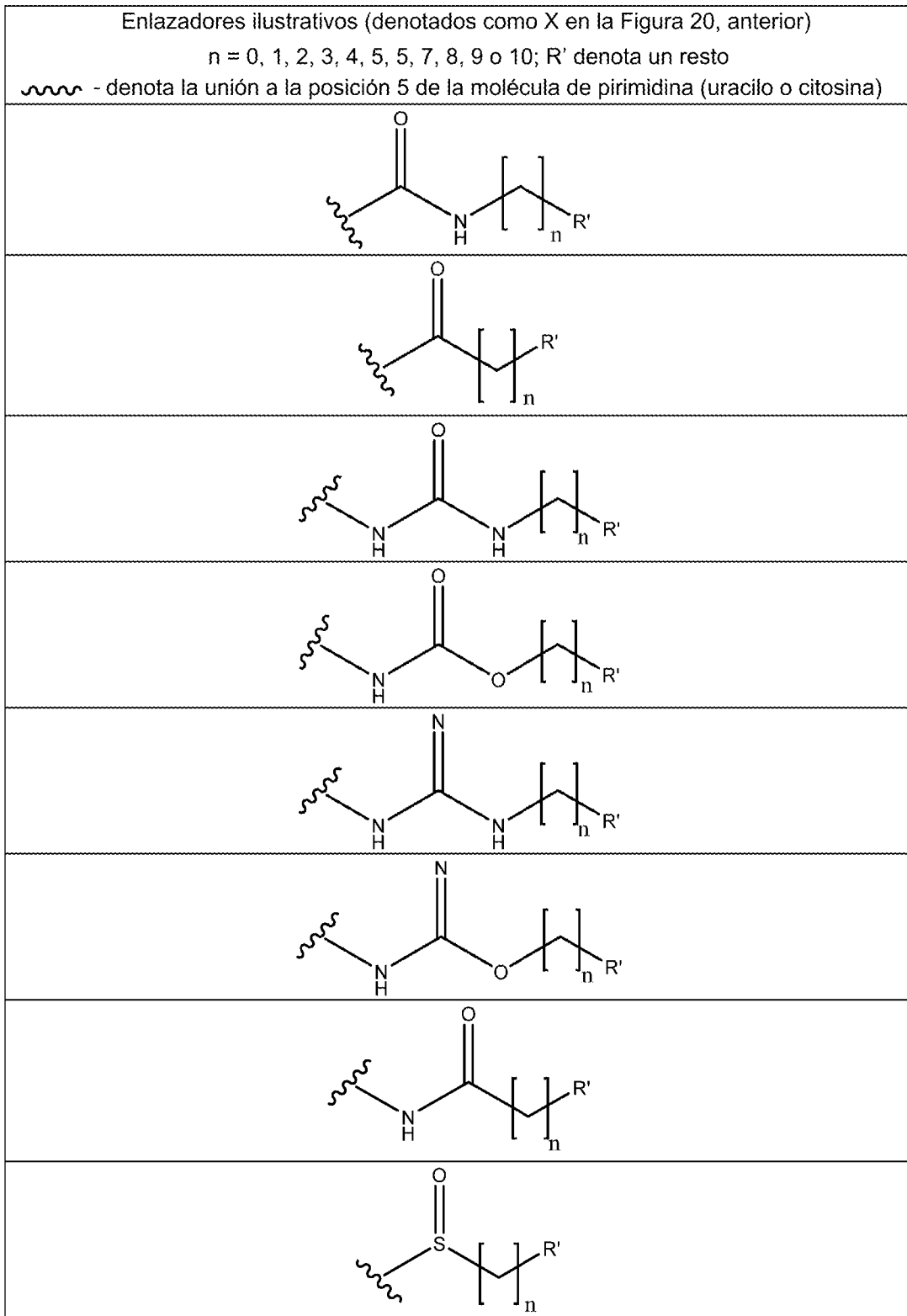


~~~~~ - denota la unión a la cadena principal de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, la cadena principal de fosfato desoxirribosa)

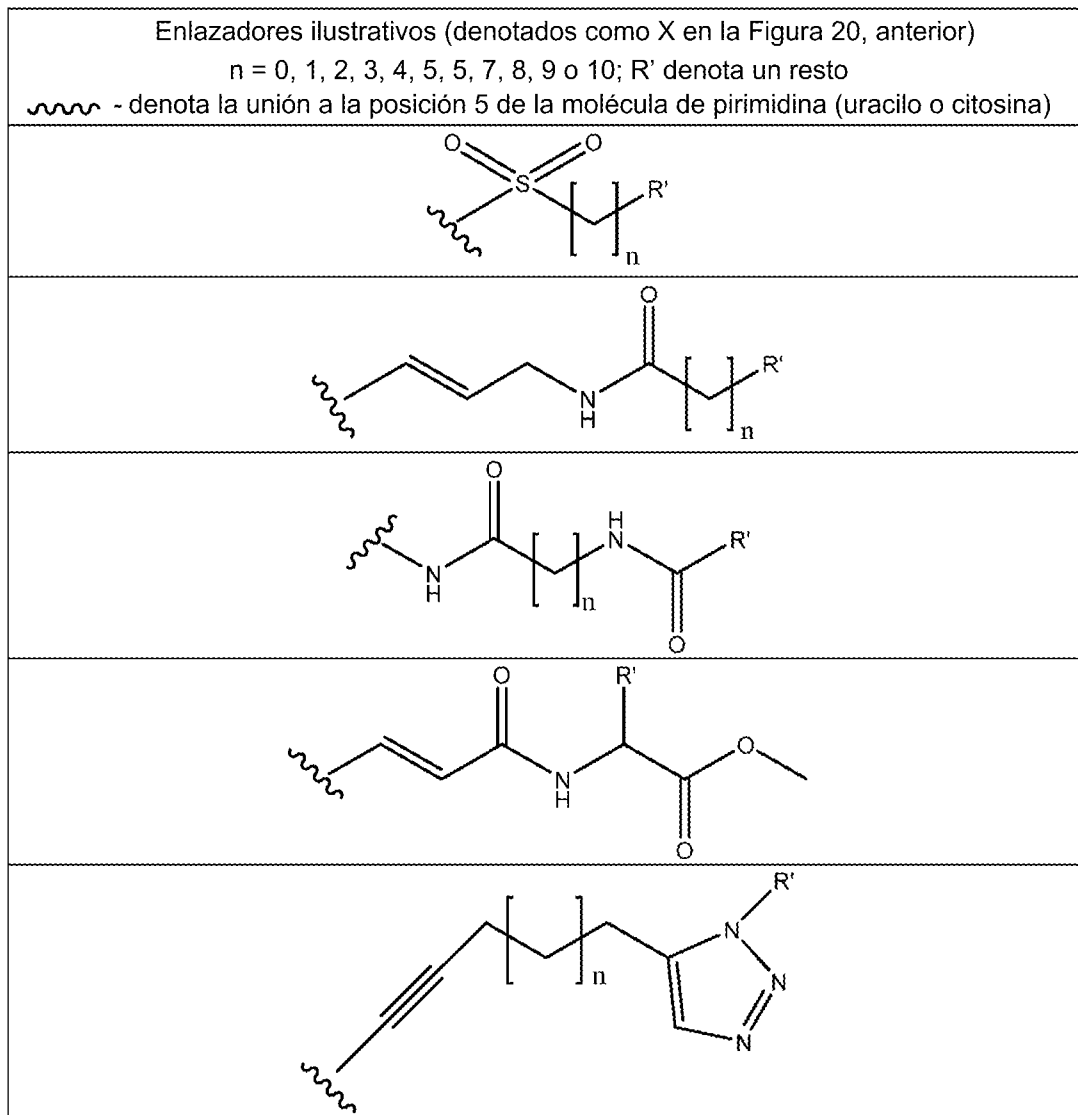
X - denota un enlazador unido a la posición 5 de la molécula de pirimidina (uracilo o citosina)

R' - denota un resto unido a la posición 5 de la molécula de pirimidina a través del enlazador (X)

**FIG. 20**



**FIG. 20 (cont.)**



**FIG. 20 (cont.)**

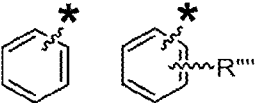




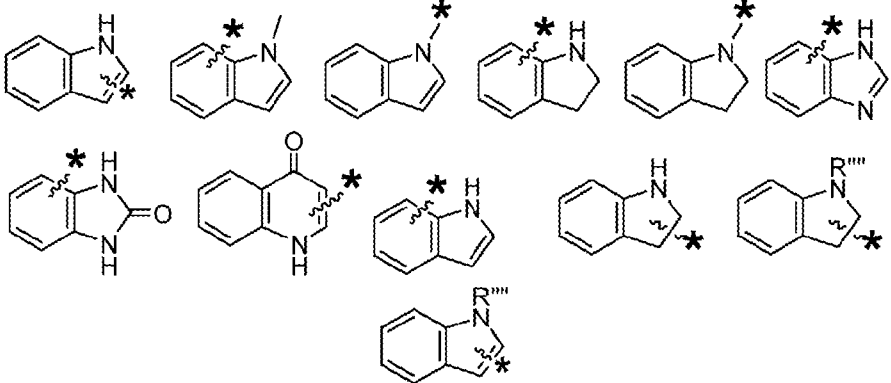
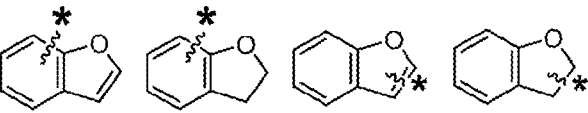
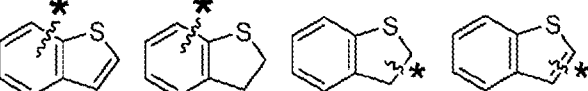
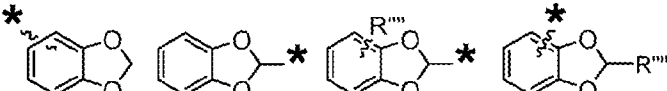
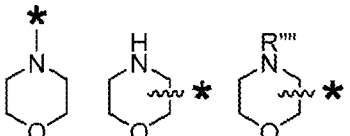
| Grupo | Estructuras R' (* denota el punto de unión del grupo R' a X (enlazador))             |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| I     |    |
| II    |    |
| III   |    |
| IV    |    |
| V     |     |
| VI    |   |
| VII   |  |
| VIII  |  |
| IX    |  |
| X     |  |

FIG. 20 (cont.)

| Grupo | Estructuras R' (* denota el punto de unión del grupo R' a X (enlazador)) |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|
| XI    |                                                                          |
| XII   |                                                                          |
| XIII  |                                                                          |
| XIV   |                                                                          |
| XV    |                                                                          |
| XVI   |                                                                          |
| XVII  |                                                                          |
| XVIII |                                                                          |
| XIX   |                                                                          |
| XX    |                                                                          |

R'' y R''' se seleccionan, independientemente, de un halógeno (-F, -Cl, -Br, -I); nitrilo (-CN); -NH<sub>2</sub>; -OH; alquilo (C1-C20) inferior ramificado; alquilo (C1-C20) inferior lineal; amida primaria; amida secundaria; amida terciaria; y grupo alcoxi.

FIG. 20 (cont.)

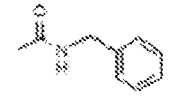
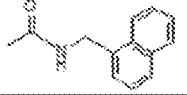
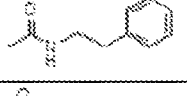

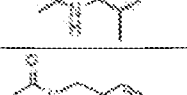

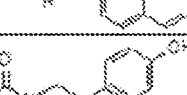
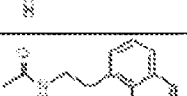
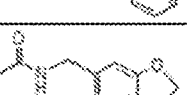
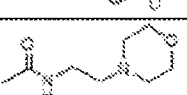



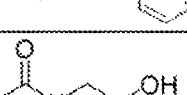
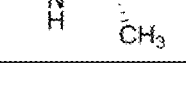
| Abreviatura | Modificación dU en 5 unida a través de un enlace de amida | Estructura química                                                                    |
|-------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Bn          | bencilmetilo                                              |    |
| Nap         | 1-naftilmetilo                                            |    |
| PE          | 2-feniletilo                                              |    |
| PP          | 3-fenilpropilo                                            |    |
| iBu         | iso-butilo                                                |    |
| FBn         | 4-fluorobencilmetilo                                      |    |
| 2Nap        | 2-naftilmetilo                                            |   |
| Tyr         | tirosilo                                                  |  |
| NE          | 1-naftiletilo                                             |  |
| MBn         | 3,4-metilendioxibencilo                                   |  |
| MOE         | morfolinoetilo                                            |  |
| BF          | 3-benzofuraniletilo                                       |  |
| BT          | 3-benzotiofeniletilo                                      |  |
| Trp         | 3-indol-2-etilo                                           |  |
| Thr         | (R)-2-hidroxipropilo                                      |  |

FIG. 21

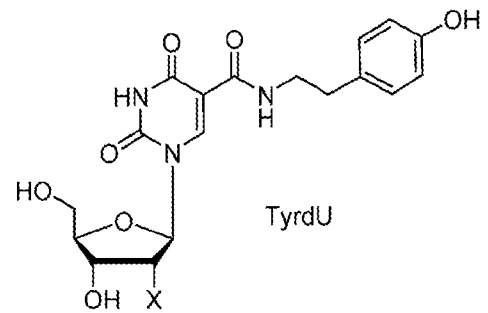
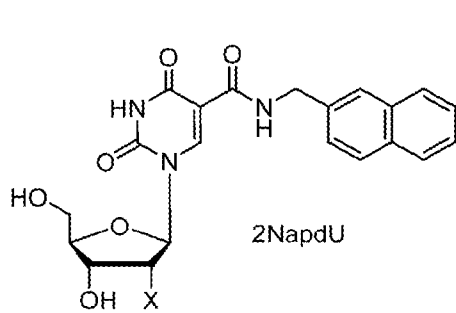
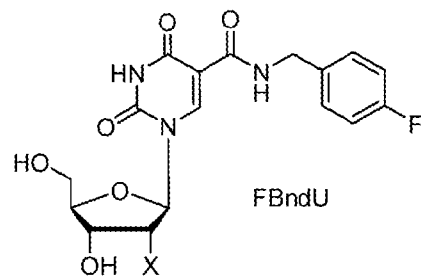
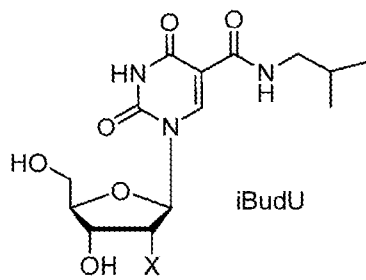
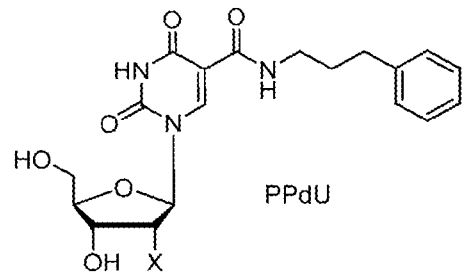
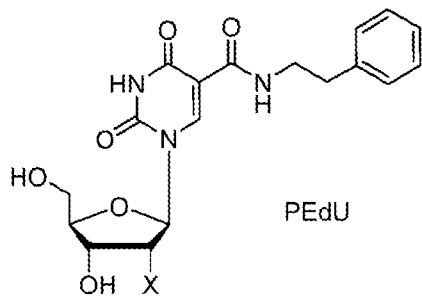
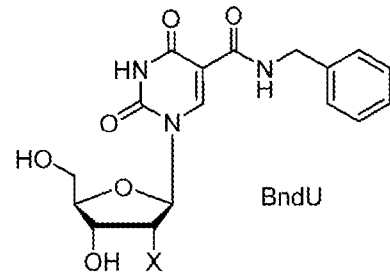
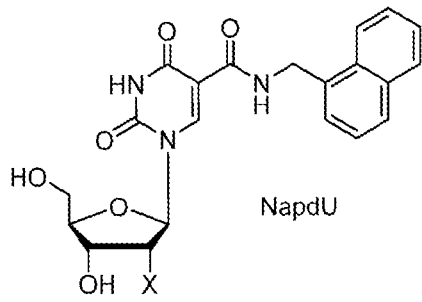
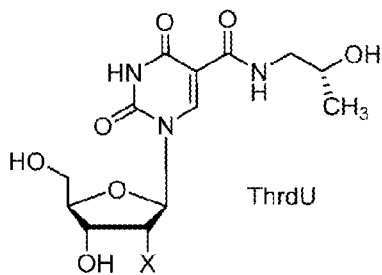
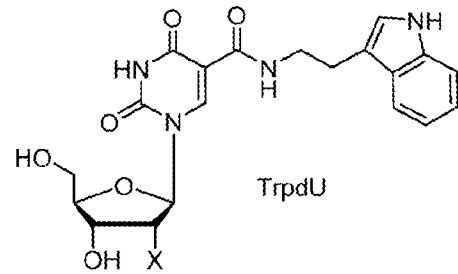
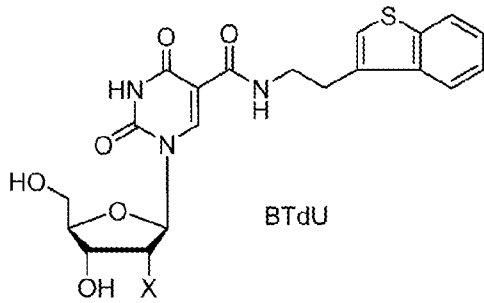
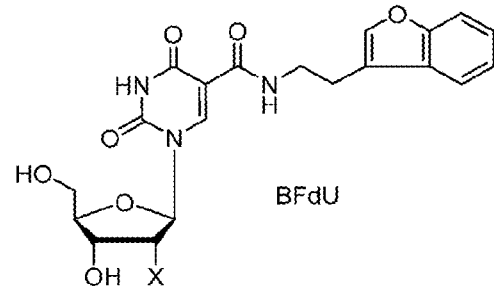
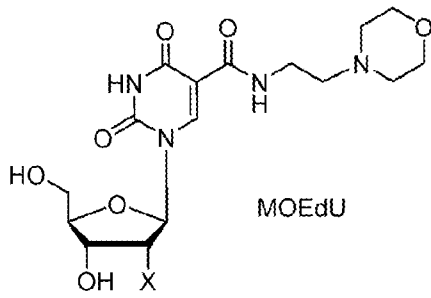
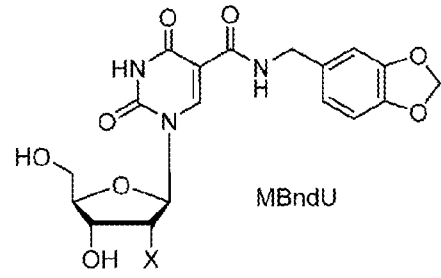
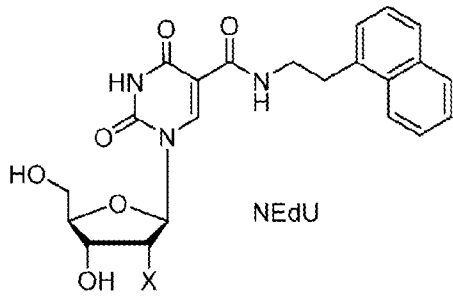


FIG. 21 (cont.)



**FIG. 21 (cont.)**


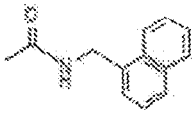
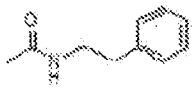

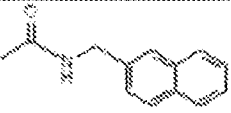
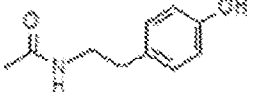

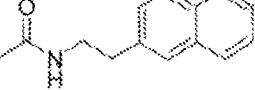
| Abreviatura | Modificación dC en 5 unida a través de un enlace de amida | Estructura química                                                                    |
|-------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Bn          | bencilmetilo                                              |    |
| Nap         | 1-naftilmetilo                                            |    |
| PE          | 2-feniletilo                                              |    |
| PP          | 3-fenilpropilo                                            |    |
| 2Nap        | 2-naftilmetilo                                            |    |
| Tyr         | tirosilo                                                  |  |
| NE          | 1-naftiletilo                                             |  |
| 2NE         | 2-naftil-2-etilo                                          |  |

FIG. 22

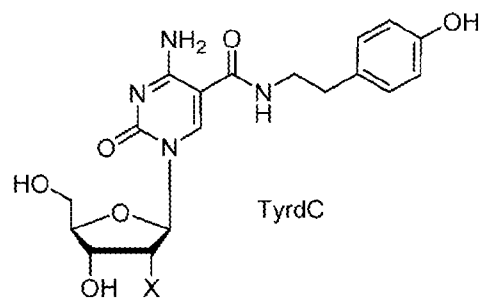
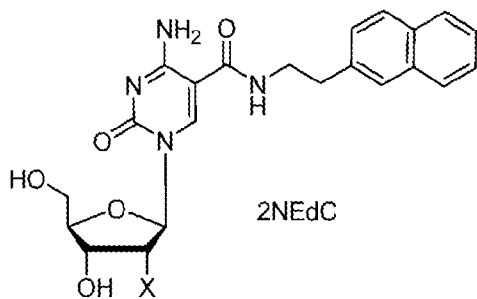
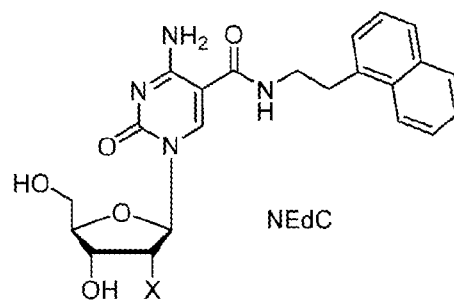
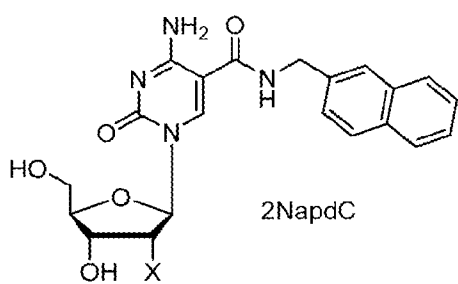
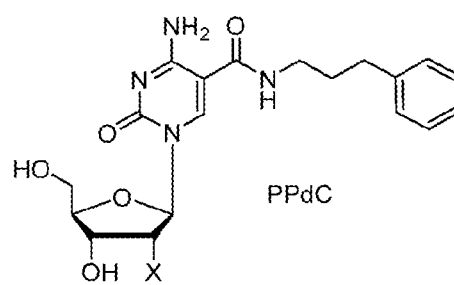
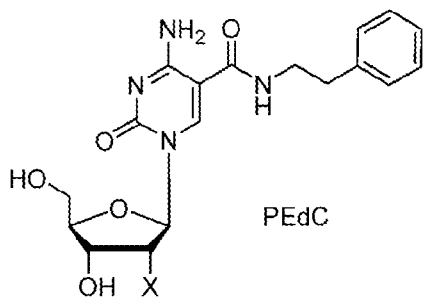
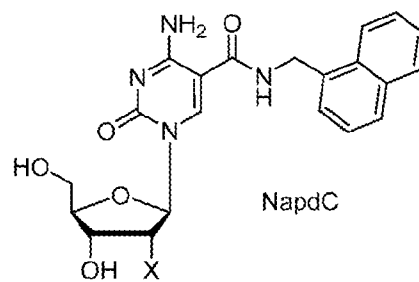
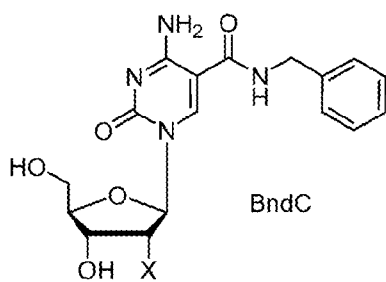


FIG. 22 (cont.)