

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 123**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6811** (2008.01)

**C12Q 1/6897** (2008.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/115** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2017 PCT/IB2017/001113**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018 WO18025085**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2017 E 17790843 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023 EP 3494229**

54 Título: **Cribado de alta productividad basado en células para aptámeros**

30 Prioridad:

**03.08.2016 US 201662370599 P**

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

**03.06.2024**

73 Titular/es:

**MEIRAGTX UK II LIMITED (100.0%)  
92 Britannia Walk  
London N1 7NQ, GB**

72 Inventor/es:

**GUO, XUECUI;  
FENG, LEI y  
FORBES, ALEXANDRIA**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 971 123 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

Cribado de alta productividad basado en células para aptámeros

## 5 Campo de la invención

10 La invención proporciona métodos de cribado para identificar un aptámero que se une específicamente a un ligando, o un ligando que se une específicamente a un aptámero, en una célula eucariota utilizando un casete de polinucleótido para la regulación de la expresión de un gen indicador donde el casete de polinucleótido contiene un ribointerruptor en el contexto de un 5' intrón-exón alternativo-3' intrón. El ribointerruptor comprende una región efectora y un aptámero de manera que cuando el aptámero se une a un ligando, se produce la expresión del gen indicador.

## 15 Antecedentes de la invención

El empalme se refiere al proceso mediante el cual la secuencia intrónica se elimina del pre-ARN mensajero naciente (pre-ARNm) y los exones se unen entre sí para formar el ARNm. Los sitios de empalme son uniones entre exones e intrones, y se definen por diferentes secuencias consenso en los extremos 5' y 3' del intrón (es decir, los sitios donador y aceptor de empalme, respectivamente). El empalme alternativo de pre-ARNm, o empalme alternativo, es un proceso generalizado que ocurre en la mayoría de los genes humanos que contienen múltiples exones. Se lleva a cabo mediante una gran estructura de múltiples componentes llamada el espliceosoma, que es una colección de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) y una serie diversa de proteínas auxiliares. Mediante reconocimiento de varias secuencias reguladoras cis, el espliceosoma define límites de exón/intrón, elimina secuencias intrónicas y empalma entre sí los exones en un mensaje traducible final (es decir, el ARNm). En el caso del empalme alternativo, ciertos exones pueden incluirse o excluirse para variar el mensaje de codificación final, cambiando así la proteína expresada resultante.

La presente invención utiliza el control mediado por ligando/aptámero de empalme alternativo para identificar pares de aptámero/ligando que se unen en el contexto de una célula eucariota diana.

30 Antes de la presente invención, se han generado aptámeros contra una variedad de ligandos por medio del cribado *in vitro*, sin embargo, pocos han demostrado ser efectivos en células, lo que destaca la necesidad de sistemas para cribar aptámeros que funcionen en el organismo de elección.

35 Wang, Z. et al. (Systematic Identification and Analysis of Exonic Splicing Silencers, CELL (2004), vol. 119, n.º 6, páginas 831-845) describen un sistema indicador de empalme *in vivo* para cribar una biblioteca de decanucleótidos aleatorios con el fin de identificar silenciadores de empalme exónico. El documento US 2004/126882 A1 describe aplicaciones de detección *in vivo* de ácidos nucleicos regulables, catalíticamente activos en donde la actividad catalítica del RCANA está regulada por un efector.

## 40 Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar un aptámero que se une a un ligando en células eucariotas que comprende las etapas de:

- 45 (a) proporcionar una biblioteca de aptámeros,
- (b) introducir miembros de la biblioteca de aptámeros en un casete de polinucleótido para la expresión mediada por ligando de un gen indicador para crear una biblioteca de ribointerruptores,
- 50 (c) introducir la biblioteca de ribointerruptores en células eucariotas, y
- (d) poner en contacto las células eucariotas con un ligando, y
- 55 (e) medir la expresión del gen indicador, en donde el casete de polinucleótido comprende un exón empalmado de forma alternativa, flanqueado por un intrón 5' y un intrón 3', y un ribointerruptor que comprende (i) una región efectora que comprende un tallo que incluye el sitio de empalme 5' del intrón 3' y una secuencia complementaria a la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3', y (ii) un aptámero colocado entre la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3' y la secuencia complementaria, en donde el exón empalmado de forma alternativa comprende un codón de parada que está en el marco con el gen indicador cuando el exón empalmado de forma alternativa se empalma en el ARNm del gen indicador.
- 60

En una realización, la biblioteca de aptámeros comprende aptámeros que tienen uno o más nucleótidos aleatorizados. La biblioteca de aptámeros puede comprender aptámeros que tienen secuencias completamente aleatorizadas. La biblioteca de aptámeros puede comprender aptámeros que tienen entre

aproximadamente 15 y aproximadamente 200 nucleótidos de longitud.

5 La biblioteca de aptámeros puede comprender aptámeros que tienen entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. La biblioteca de aptámeros puede comprender más de 100.000 aptámeros. La biblioteca de aptámeros puede comprender más de 1.000.000 de aptámeros.

10 En una realización, el ligando es una molécula pequeña. El ligando de molécula pequeña puede ser exógeno a la célula eucariota. En otra realización, el ligando es una molécula producida por la célula eucariota que incluye, p. ej., un metabolito, ácido nucleico, vitamina, cofactor, lípido, monosacárido y segundo mensajero.

15 En una realización, la célula eucariota se selecciona de una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta y una célula de levadura. La célula eucariota puede derivar de un ratón, un ser humano, una mosca (p. ej., *Drosophila melanogaster*), un pez (p. ej., *Danio rerio*) o un gusano nematodo (p. ej., *Caenorhabditis elegans*).

20 En una realización, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en una proteína fluorescente, luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa y peroxidasa de rábano picante. En una realización el gen indicador es una citocina, una molécula de señalización, una hormona del crecimiento, un anticuerpo, un ARN regulador, una proteína terapéutica o un péptido. La expresión del gen indicador puede ser más de aproximadamente 10 veces mayor cuando el ligando se une específicamente al aptámero que los niveles de expresión del gen indicador cuando el ligando está ausente. La expresión del gen indicador también puede ser más de aproximadamente 20, 50, 100, 200, 500 o 1.000 veces mayor cuando el ligando se une específicamente al aptámero que los niveles de expresión del gen indicador cuando el ligando está ausente.

25 En una realización, los intrones 5' y 3' derivan del intrón 2 del gen de  $\beta$ -globina humana. El intrón 5' puede comprender un codón de parada en el marco con el gen diana. En una realización, los intrones 5' y 3' son cada uno independientemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. En una realización, los intrones 5' y 3' son cada uno independientemente de aproximadamente 125 a aproximadamente 240 nucleótidos de longitud. Los intrones 5' y/o 3' pueden haber sido modificados para incluir, o alterar la secuencia de, un potenciador de empalme de intrones, un potenciador de empalme de intrones, un sitio de empalme 5', un sitio de empalme 3', o la secuencia de punto de ramificación.

30 En una realización, el tallo de la región efectora del ribointerruptor tiene de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 pares de bases de longitud. En una realización, el tallo de la región efectora tiene de 8 a 11 pares de bases de longitud.

35 En una realización, el exón empalmado de forma alternativa deriva del exón 2 del gen de dihidrofolato reductasa humana (DHFR), exón 5 de tumor de Wilms 1 humano mutante, exón 16 de la proteína quinasa II delta dependiente de calcio/calmodulina de ratón, exón 6 de SIRT1. En una realización, el exón empalmado de forma alternativa es el exón 2 de DHFR modificado. En una modalidad, el exón empalmado de forma alternativa se ha modificado en uno o más del grupo que consiste en alterar la secuencia de un silenciador de empalme de exón, alterar la secuencia de un potenciador de empalme de exón, añadir un potenciador de empalme de exón y añadir un donador de empalme de exón. En una realización, el exón empalmado de forma alternativa es sintético (es decir, no deriva de un exón natural).

40 En una realización, la biblioteca de aptámeros se divide en una biblioteca de aptámeros más pequeña antes de introducir en los casetes de polinucleótidos, que comprende las etapas:

45 (a) proporcionar una biblioteca de aptámeros aleatorizados en donde los aptámeros de la biblioteca comprenden múltiples regiones constantes 5' y 3' y uno o más nucleótidos aleatorizados,

(b) realizar una PCR de dos ciclos utilizando la biblioteca de aptámeros aleatorizados como molde y un primer cebador y segundo cebador que son complementarios de las regiones constantes 5' y 3',

50 (c) aislar los productos de la PCR de dos ciclos, y

(d) amplificar por PCR un subconjunto de los productos aislados de la PCR de dos ciclos usando cebadores complementarios de un subconjunto de las regiones constantes 5' y 3' únicas.

55 En una realización, la biblioteca de ribointerruptores se divide en una o más sub-bibliotecas de ribointerruptores antes de introducirlas en las células eucariotas. En una realización, el método para dividir la biblioteca de ribointerruptores en sub-bibliotecas comprende las etapas de:

60 (a) introducir una biblioteca de aptámeros en un plásmido que comprende un casete de polinucleótido de regulación génica para hacer una biblioteca de ribointerruptores;

(b) introducir la biblioteca de ribointerruptores en bacterias (p. ej., *E. coli*); y

- 5 (c) recoger clones bacterianos (por ejemplo, escogiendo colonias bacterianas) y extraer ADN plasmídico para obtener sub-bibliotecas de plásmidos de ribointerruptores (denominadas en el presente documento sub-bibliotecas primarias);

10 En realizaciones, se generan sub-bibliotecas secundarias de ribointerruptores a partir de una sub-biblioteca primaria de plásmidos de ribointerruptores introduciendo una sub-biblioteca primaria en bacterias, recolectando clones bacterianos y aislando el ADN plasmídico. La sub-biblioteca primaria o secundaria se introduce entonces en células eucariotas, las células eucariotas se ponen en contacto con un ligando, y se mide la expresión del gen indicador para determinar si uno o más aptámeros en la biblioteca se unen al ligando en el contexto de la célula eucariota.

- 15 Un aptámero que se une a un ligando diana puede seleccionarse por los métodos anteriores. El aptámero puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 14 a 27. La secuencia de aptámero también puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 24.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar un ligando que se une a un aptámero en una célula eucariota que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una biblioteca de ligandos,
- (b) proporcionar un casete de polinucleótido para la expresión mediada por ligando de un gen indicador,
- 25 (c) introducir el casete de polinucleótido en la célula eucariota,
- (d) poner en contacto grupos individuales de la célula eucariota con miembros de la biblioteca de ligandos, y
- 30 (e) medir la expresión del gen indicador,

35 en donde el casete de polinucleótido comprende un exón empalmado de forma alternativa, flanqueado por un intrón 5' y un intrón 3', y un ribointerruptor que comprende (i) una región efectora que comprende un tallo que incluye la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3' y una secuencia complementaria del sitio de empalme 5' del intrón 3', y (ii) un aptámero colocado entre la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3' y la secuencia complementaria, en donde el exón empalmado de forma alternativa comprende un codón de parada que está en el marco con el gen indicador cuando el exón empalmado de forma alternativa se empalma en el ARNm del gen indicador.

- 40 En una realización, el ligando es una molécula pequeña. El ligando de molécula pequeña puede ser exógeno a la célula eucariota. En otra realización, el ligando es una molécula producida por la célula eucariota que incluye, p. ej., un metabolito, ácido nucleico, vitamina, cofactor, lípido, monosacárido y segundo mensajero.

45 En una realización, la célula eucariota se selecciona de una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta y una célula de levadura. La célula eucariota puede derivar de un ratón, un ser humano, una mosca (p. ej., *Drosophila melanogaster*), un pez (p. ej., *Danio rerio*) o un gusano nematodo (p. ej., *Caenorhabditis elegans*).

50 En una realización, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en una proteína fluorescente, luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa y peroxidasa de rábano picante. En una realización, el gen indicador es una citocina, una molécula de señalización, una hormona del crecimiento, un anticuerpo, un ARN regulador, una proteína terapéutica o un péptido. La expresión del gen indicador puede ser más de aproximadamente 10 veces mayor cuando el ligando se une específicamente al aptámero que los niveles de expresión del gen indicador cuando el ligando está ausente. La expresión del gen indicador puede ser más de aproximadamente 20, 50, 100, 200,

55 500 o 1000 veces mayor cuando el ligando se une específicamente al aptámero que los niveles de expresión del gen indicador cuando el ligando está ausente.

60 En una realización, los intrones 5' y 3' derivan del intrón 2 del gen de  $\beta$ -globina humana. El intrón 5' puede comprender un codón de parada en el marco con el gen diana. En una realización, los intrones 5' y 3' son cada uno independientemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. En una realización, los intrones 5' y 3' son cada uno independientemente de aproximadamente 125 a aproximadamente 240 nucleótidos de longitud. Los intrones 5' y/o 3' pueden haber sido modificados para incluir, o alterar la secuencia de, un potenciador de empalme de intrones, un potenciador de empalme de exones, un sitio de empalme 5', un sitio de empalme 3', o la secuencia de punto de ramificación.

65

En una realización, el tallo de la región efectora del ribointerruptor tiene de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 pares de bases de longitud. En una realización, el tallo de la región efectora tiene de 8 a 11 pares de bases de longitud.

5 En una realización, el exón empalmado de forma alternativa deriva del exón 2 del gen de dihidrofolato reductasa humana (DHFR), exón 5 de tumor de Wilms 1 humano mutante, exón 16 de la proteína quinasa II delta dependiente de calcio/calmodulina de ratón, exón 6 de SIRT1. En una realización, el exón empalmado de forma alternativa es un exón 2 de DHFR modificado. En una modalidad, el exón empalmado de forma alternativa se ha modificado en uno o más del grupo que consiste en alterar la secuencia de un silenciador de empalme de  
 10 exón, alterar la secuencia de un potenciador de empalme de exón, añadir un potenciador de empalme de exón y añadir un donador de empalme de exón. En una realización, el exón empalmado de forma alternativa es sintético (es decir, no deriva de un exón natural).

15 En una realización, la biblioteca de aptámeros aleatorizados comprende aptámeros que tienen uno o más nucleótidos aleatorizados. La biblioteca de aptámeros aleatorizados puede comprender más de aproximadamente 100.000 aptámeros. La biblioteca de aptámeros aleatorizados puede comprender más de aproximadamente 1.000.000 aptámeros.

20 En una realización, el primer o segundo cebador en la PCR de dos ciclos comprende un marcador seleccionado del grupo que consiste en biotina, digoxigenina (DIG), bromodesoxiuridina (BrdU), fluoróforo, un grupo químico, p. ej., grupo tiol, o un grupo químico, p. ej., azidas utilizadas en la química click.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1a. Esquema de la construcción de ribointerruptor. Se insertó una secuencia de intrón de beta-globina truncada en la secuencia codificante del gen indicador, y se puso un exón 2 de DHFR que contenía codón de parada, mutante (mDHFR) en el intrón insertado, formando así una plataforma de expresión génica de tres exones mediante la cual se regula la expresión génica del indicador mediante la inclusión/exclusión del exón mDHFR. Se forma una estructura de horquilla/tallo que incluye el sitio de unión de U1 en el intrón secuencia  
 30 abajo (3') del exón de mDHFR con la secuencia genomanipulada complementaria del sitio de unión de U1, que bloquea la unión de U1, conduciendo de este modo a la exclusión del exón de mDHFR que contiene el codón de parada y la expresión del gen diana. La secuencia de aptámero se injerta entre el sitio de unión de U1 y su secuencia complementaria, permitiendo el control de la formación de horquilla por la unión de aptámero/ligando.

35 Figura 1b. Respuestas a la dosis de construcciones con casetes reguladores que contienen diferentes ribointerruptores basados en aptámeros. Los ribointerruptores de guanina indujeron la expresión del gen indicador respondiendo no solo al tratamiento con guanina sino también con guanosina.

40 Figura 1c y 1d. Gráfico que demuestra que el ribointerruptor xpt-G17 induce actividad de luciferasa tras tratamiento con análogos de guanina.

Figura 1e. Tasa de inducción de la actividad de luciferasa por el ribointerruptor xpt-G17 tras el tratamiento con compuestos.

45 Figura 2. Esquema de un molde para generar secuencias de aptámero aleatorizado. La secuencia de aptámero (barra en blanco) está flanqueada por regiones constantes (barras negras), que contienen el sitio Bsal para facilitar la clonación del aptámero en un casete de regulación génica para generar ribointerruptores.

50 Figuras 3a a 3e. Descripción esquemática del método para dividir una biblioteca grande de aptámeros aleatorizados en sub-bibliotecas más pequeñas.

Figura 3a. Diagrama esquemático de la estrategia de dos etapas para dividir una biblioteca de aptámeros grande. La primera etapa es añadir un par único de marcadores de secuencia a cada molde de oligonucleótido  
 55 aptámero. Después de la primera etapa, los moldes con secuencias de marcadores únicas se amplifican usando cebadores que son específicos para las secuencias marcadas.

Figura 3b. Tres enfoques para unir secuencias de marcadores a moldes: secuencias de marcadores incorporadas por medio de PCR usando cebadores que contienen secuencias de marcadores en el extremo 5'  
 60 de los cebadores (I); secuencias de marcadores unidas ligando secuencia molde monocatenaria con secuencias de marcadores monocatenarias mediante ARN ligasa T4 (II); secuencias de marcadores unidas a moldes ligando secuencias molde bicatenarias con secuencia de marcador bicatenaria mediante ADN ligasa T4 (III).

65 Figura 3c. Diagrama esquemático de la PCR de dos ciclos. Para el ciclo 1, solo los cebadores inversos JR que

contienen secuencia de marcador en el extremo 5'. Después del primer ciclo, la hebra recién sintetizada tiene una secuencia de marcador en su extremo 5'. Para el ciclo 2, se añade el cebador directo JF marcado con biotina a la reacción de PCR, que solo puede usar la hebra recién sintetizada como molde, generando así los

5

Figura 3d. Generación de la biblioteca de aptámeros marcados. Después de marcar los moldes con marcadores de secuencia y molécula de biotina, se usan perlas de estreptavidina para separar los moldes monocatenarios marcados/etiquetados del resto de los componentes de reacción a través de la desnaturalización de los oligos y el lavado de las perlas. A continuación, los moldes marcados se amplifican y expanden utilizando una mezcla de cebadores (cebadores F y R) que son específicos para las secuencias marcadas, generando así una biblioteca de aptámeros marcados que están listos para la PCR posterior utilizando un solo par de cebadores específicos de secuencia de marcador para generar sub-bibliotecas de la biblioteca de aptámeros original.

10

Figura 3e. Las sub-bibliotecas de aptámeros se amplifican por PCR usando la estrategia de división. La biblioteca de aptámeros ( $10^6$ , generada como en el Ejemplo 2) se marcó por PCR usando 2 cebadores directos (JF1-2) y 8 cebadores inversos (JR1-8), con número de copias de molde de 1, 2,3 o 4,6. Los moldes marcados aislados se expandieron mediante una mezcla de cebadores específicos de marcador F1-2 y R1-8, y los productos de PCR se sometieron a PCR con cebadores universales (panel izquierdo), un solo par de cebadores específicos de marcador F1 y R1 (panel medio), o un solo par de cebadores no relevantes de F3 y R1 (panel derecho). Se usó agua como control de blanco para los moldes.

20

Figura 4. Ensayo de sensibilidad en el ensayo basado en células para cribado de biblioteca de ribointerruptores. La construcción xpt-G17 se mezcló con la construcción SR-mut en diferentes relaciones moleculares, y el ADN de las construcciones mezcladas se transfeció en células HEK-293 y se trató con guanina. La tasa de inducción de la actividad de luciferasa se calculó como la actividad de luciferasa inducida con guanina dividida por la actividad de luciferasa obtenida sin tratamiento con guanina.

25

Figura 5a. Diagrama esquemático de construcción de una biblioteca de plásmidos que contienen ribointerruptores. Los oligos de aptámeros monocatenarios se amplifican primero por PCR usando cebadores universales para convertir el molde de aptámero monocatenario en bicatenario. Los oligos bicatenarios se digieren después con Bsal y se ligan al vector digerido con Bsal para generar construcciones con ribointerruptores. El ADN plasmídico se electropora entonces en células DH5a electrocompetentes. Se recogen más de  $5 \times 10^6$  colonias para cubrir más de 99% de la biblioteca de aptámeros inicial ( $10^6$ ).

30

35

Figura 5b. Diagrama esquemático de la división de la biblioteca de plásmidos de ribointerruptores en sub-bibliotecas. La biblioteca de plásmidos de ribointerruptores se transforma en células DH5a químicamente competentes. A continuación, las bacterias transformadas se siembran en placas de agar. Se recoge cierto número de colonias bacterianas de cada placa de agar individual y el ADN plasmídico se extrae de la colección de colonias individuales por separado. El ADN plasmídico obtenido de cada colección de colonias forma la sub-biblioteca de ribointerruptores. El enfoque de división se puede repetir hasta que se logre el tamaño deseado de las sub-bibliotecas.

40

Figura 5c. Composición de secuencia única de las sub-bibliotecas secundarias de los ribointerruptores determinada por secuenciación de nueva generación. Las secuencias con más de 12 lecturas del análisis de secuenciación se consideraron secuencias verdaderas.

45

Figura 5d. Comparación de la composición de secuencias únicas entre dos sub-bibliotecas secundarias que se generan a partir de la misma sub-biblioteca primaria P1S\_003. Un gráfico circular indica el número de secuencias únicas en cada sub-biblioteca y el número de las secuencias que solapan entre las dos bibliotecas de ribointerruptores.

50

Figura 5e. Comparación de la composición de secuencias únicas entre dos sub-bibliotecas secundarias que se generan a partir de diferentes sub-bibliotecas primarias, P1S\_003 y P1S\_007, respectivamente. Un gráfico circular indica el número de secuencias únicas en cada sub-biblioteca y el número de las secuencias que solapan entre las dos bibliotecas de ribointerruptores.

55

Figuras 6a y 6b. El ADN plasmídico de 6 de 100 sub-bibliotecas primarias (60 k) (Figura 6a) o 100 sub-bibliotecas secundarias (tamaño de 600) (Figura 6b) se dispuso en el formato de placa de 96 pocillos, y se transfeció en células HEK-293. La tasa de inducción de la actividad de luciferasa se calculó como la actividad de luciferasa inducida con guanina dividida por la actividad de luciferasa obtenida sin tratamiento con guanina.

60

Figura 6c. Resultados del cribado de la sub-biblioteca de ribointerruptores usando dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD<sup>+</sup>) como ligando. Las sub-bibliotecas de la biblioteca de ribointerruptores P2 se dispusieron en formato de 96 pocillos. Las células HEK 293 se sembraron en placa de 96 pocillos y se transfecaron con ADN

65

de la biblioteca de ribointerruptores. Cuatro horas después de la transfección, las células se trataron con NAD<sup>+</sup> 100 µM. La actividad de luciferasa se midió 20 horas después del tratamiento con NAD<sup>+</sup>. La tasa de inducción se calculó como la relación de la actividad de luciferasa obtenida de células tratadas con NAD<sup>+</sup> dividida por la actividad de luciferasa obtenida de células sin tratamiento con NAD<sup>+</sup>. Cada punto en el gráfico de puntos representa la tasa de inducción de una sub-biblioteca o construcción G17 como se indica.

Figura 6d. Resultados del cribado de ribointerruptores usando NAD<sup>+</sup> como ligando. Cada construcción de ribointerruptor individual se dispuso en formato de 96 pocillos. Las células HEK 293 se sembraron en placas de 96 pocillos y se transfectaron con construcciones de ribointerruptores. 4 horas después de la transfección, las células se trataron con NAD<sup>+</sup> 100 µM. La actividad de luciferasa se midió 20 horas después del tratamiento con NAD<sup>+</sup>. La tasa de inducción se calculó como la relación de la actividad de luciferasa obtenida de células tratadas con NAD<sup>+</sup> dividida por la actividad de luciferasa obtenida de células sin tratamiento con NAD<sup>+</sup>. Cada punto en el gráfico de puntos representa la tasa de inducción de cada construcción de ribointerruptor individual o construcción G17 como se indica.

Figura 6e y 6f. La construcción con nueva secuencia de aptámero muestra una respuesta mejorada al tratamiento con NAD<sup>+</sup> de una manera dependiente de la dosis en comparación con el ribointerruptor G17. Las células HEK 293 se transfectaron con el G17 o la construcción n.º 46 con una nueva secuencia de aptámero. 4 horas después de la transfección, las células se trataron con diferentes dosis de NAD<sup>+</sup>. La actividad de luciferasa se midió 20 horas después del tratamiento con NAD<sup>+</sup>. La tasa de inducción se calculó como la relación de la actividad de luciferasa obtenida de células tratadas con NAD<sup>+</sup> dividida por la actividad de luciferasa obtenida de células sin tratamiento con NAD<sup>+</sup>.

Descripción detallada de la invención

Métodos de cribado de aptámero/ligando

La presente invención proporciona métodos de cribado para identificar aptámeros que se unen a un ligando, y ligandos que se unen a un aptámero, en el contexto de una célula, tejido u organismo eucariota. En un aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar un aptámero que se une a un ligando en células eucariotas que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una biblioteca de aptámeros,
- (b) introducir miembros de la biblioteca de aptámeros en casetes de polinucleótidos para la expresión mediada por ligando de un gen indicador,
- (c) introducir los casetes de polinucleótidos que contienen aptámero en células eucariotas, y
- (d) poner en contacto las células eucariotas con un ligando, y
- (e) medir la expresión del gen indicador.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar un ligando que se une a un aptámero en una célula eucariota que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una biblioteca de ligandos,
- (b) proporcionar un casete de polinucleótido para la expresión mediada por ligando de un gen indicador,
- (c) introducir el casete de polinucleótido en la célula eucariota,
- (d) poner en contacto grupos individuales de la célula eucariota con miembros de la biblioteca de ligandos, y
- (e) medir la expresión del gen indicador.

Los métodos de cribado de la presente invención utilizan los casetes de polinucleótidos de regulación génica descritos en el documento PCT/US2016/016234. Estos casetes de regulación génica comprenden un ribointerruptor en el contexto de un 5' intrón-exón alternativo-3' intrón. El casete de regulación génica se refiere a una construcción de ADN recombinante que, cuando se incorpora en el ADN de un gen diana (p. ej., un gen indicador), proporciona la capacidad de regular la expresión del gen diana mediante el empalme alternativo mediado por aptámero/ligando del pre-ARNm resultante. El casete de regulación génica comprende además un ribointerruptor que contiene una región sensora (p. ej., un aptámero) y una región efectora que en conjunto son responsables de detectar la presencia de un ligando que se une al aptámero y alterar el empalme a un exón alternativo. Estos ribointerruptores accionados por aptámero proporcionan regulación de la expresión

génica de mamífero con una tasa de inducción de 2 a 2000, en respuesta al tratamiento con el ligando que se une al aptámero. El intervalo regulador dinámico alto sin precedentes de este ribointerruptor sintético se usa en métodos de la presente invención para proporcionar sistemas de cribado para nuevos aptámeros contra tipos deseados de ligandos, así como para ligandos óptimos contra aptámeros conocidos y nuevos en células, tejidos y organismos.

#### Ribointerruptor

El término "ribointerruptor" como se usa en el presente documento se refiere a un segmento regulador de un polinucleótido de ARN (o el ADN que codifica el polinucleótido de ARN). Un ribointerruptor en el contexto de la presente invención contiene una región sensora (p. ej., un aptámero) y una región efectora que en conjunto son responsables de detectar la presencia de un ligando (p. ej., una molécula pequeña) y alterar el empalme a un exón alternativo. El ribointerruptor puede ser recombinante, utilizando polinucleótidos de dos o más fuentes. El término "sintético" como se usa en el presente documento en el contexto de un ribointerruptor se refiere a un ribointerruptor que no se encuentra de forma natural. Las regiones sensora y efectora pueden estar unidas por un enlazador polinucleotídico. El enlazador polinucleotídico puede formar un tallo de ARN (es decir, una región del polinucleótido de ARN que es bicatenaria).

Una biblioteca de ribointerruptores como se describe en el presente documento comprende una pluralidad de secuencias de aptámeros que difieren en uno o más nucleótidos en el contexto de los casetes de polinucleótidos para la expresión mediada por ligando de un gen indicador. Por lo tanto, cada aptámero en la biblioteca, junto con una región sensora, está en el contexto de un 5' intrón-exón alternativo-3' intrón como se describe en el presente documento.

#### Región efectora

La región efectora comprende la secuencia del sitio de empalme 5' ("5' ss") del intrón 3' (es decir, la secuencia del sitio de empalme intrónico que está inmediatamente 3' del exón alternativo) y la secuencia complementaria de la secuencia 5' ss del intrón 3'. Cuando el aptámero se une a su ligando, la región efectora forma un tallo y por lo tanto evita el empalme al sitio donador de empalme en el extremo 3' del exón alternativo. En ciertas condiciones (por ejemplo, cuando el aptámero no está unido a su ligando), la región efectora está en un contexto que proporciona acceso al sitio donador de empalme en el extremo 3' del exón alternativo conduciendo a la inclusión del exón alternativo en el ARNm del gen diana.

La parte de tallo de la región efectora debe ser de una longitud suficiente (y contenido de GC) para evitar sustancialmente el empalme alternativo del exón alternativo tras la unión del ligando al aptámero, mientras que también permite el acceso al sitio de empalme cuando el ligando no está presente en cantidades suficientes. La parte de tallo de la región efectora puede comprender secuencia de tallo además de la secuencia 5' ss del intrón 3' y su secuencia complementaria. Esta secuencia de tallo adicional puede comprender la secuencia del tallo de aptámero. La longitud y secuencia de la parte de tallo se pueden modificar usando técnicas conocidas con el fin de identificar tallos que permiten una expresión de fondo aceptable del gen diana cuando no está presente ningún ligando y niveles de expresión aceptables del gen diana cuando está presente el ligando. Si el tallo es, por ejemplo, demasiado largo, puede ocultar el acceso a la secuencia 5' ss del intrón 3' en presencia o ausencia de ligando. Si el tallo es demasiado corto, puede no formar un tallo estable capaz de secuestrar la secuencia 5' ss del intrón 3', en cuyo caso el exón alternativo se empalmará en el mensaje del gen diana en presencia o ausencia de ligando. En una realización, la longitud total del tallo de la región efectora está entre aproximadamente 7 pares de bases y aproximadamente 20 pares de bases. La longitud del tallo puede estar entre aproximadamente 8 pares de bases y aproximadamente 11 pares de bases. En algunas realizaciones, la longitud del tallo es de 8 pares de bases a 11 pares de bases. Además de la longitud del tallo, el contenido del par de bases GC del tallo puede alterarse para modificar la estabilidad del tallo.

#### Aptámero/Ligando

El término "aptámero" como se usa en el presente documento se refiere a un polinucleótido de ARN (o el ADN que codifica el polinucleótido de ARN) que se une específicamente a un ligando o a un polinucleótido de ARN que se está cribando para identificar la unión específica a un ligando (es decir, un aptámero prospectivo). Una biblioteca de aptámeros es una colección de aptámeros prospectivos que comprenden múltiples aptámeros prospectivos que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de otros miembros de la biblioteca en al menos un nucleótido.

El término "ligando" se refiere a una molécula a la que se une específicamente un aptámero, o a un ligando prospectivo que se está cribando para determinar la capacidad de unirse a uno o más aptámeros. Una biblioteca de ligandos es una colección de ligandos y/o ligandos prospectivos.

En una realización, el ligando es una molécula de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 1000



Daltons) que incluye, por ejemplo, lípidos, monosacáridos, segundos mensajeros, cofactores, iones metálicos, otros productos naturales y metabolitos, ácidos nucleicos, así como la mayoría de los fármacos terapéuticos. El ligando puede ser polinucleótido con 2 o más bases nucleotídicas.

- 5 El ligando puede seleccionarse del grupo que consiste en 8-azaguanina, 5'-monofosfato de adenosina monohidrato, anfotericina B, avermectina B1, azatioprina, acetato de clormadinona, mercaptopurina, hidrocloreto de moricizina, N6-metiladenosina, nadida, progesterona, hidrocloreto de promazina, pamoato de pirvinio, sulfaguanidina, propionato de testosterona, tioguanosina, tiloxapol y vorinostat.
- 10 Los métodos de la presente invención se pueden usar para identificar un ligando que es una molécula intracelular que se une al aptámero (es decir, un ligando endógeno) en el casete de polinucleótido, produciendo de este modo la expresión del gen indicador. Por ejemplo, las células con un gen indicador que contiene el casete de polinucleótido para la expresión mediada por aptámero/ligando, pueden exponerse a una condición, tal como calor, crecimiento, transformación o mutación, que conduce a cambios en las moléculas de señalización celular, metabolitos, péptidos, lípidos, iones (p. ej.,  $Ca^{2+}$ ), etc., que pueden unirse al aptámero y producir la expresión del gen indicador. Por lo tanto, los métodos de la presente invención se pueden usar para identificar aptámeros que se unen a ligandos intracelulares en respuesta a cambios en el estado celular, incluyendo, p. ej., un cambio en la señalización celular, metabolismo celular, o mutaciones dentro de las células. Las presentes invenciones pueden utilizarse para identificar aptámeros que se unen a ligandos intracelulares presentes en células diferenciadas. Por ejemplo, los métodos de la presente invención se pueden usar para identificar ligandos o aptámeros que se unen a ligandos que están presentes en células madre pluripotentes inducidas. Los métodos de la presente invención se pueden usar para cribar la respuesta a la diferenciación celular *in vivo*, o cambios fisiológicos de células *in vivo*.
- 25 Los ligandos de aptámero también pueden ser componentes endógenos celulares que aumentan significativamente en condiciones fisiológicas/patológicas específicas, tales como transformación oncogénica, estos pueden incluir moléculas segundos mensajeros tales como GTP o GDP, calcio; ácidos grasos, o ácidos grasos que se metabolizan incorrectamente tales como 13-HODE en cáncer de mama (Flaherty, JT et al., *Plos One*, Vol. 8, e63076, 2013,; aminoácidos o metabolitos de aminoácidos; los metabolitos en la ruta de la glucólisis generalmente tienen mayores niveles en células cancerosas o en células normales en enfermedades metabólicas; y moléculas asociadas al cáncer tales como Ras o proteína Ras mutante, EGFR mutante en el cáncer de pulmón, indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) en muchos tipos de cánceres. Los ligandos endógenos incluyen metabolitos de progesterona en cáncer de mama como describe JP Wiebe (*Endocrine-Related Cancer* (2006) 13:717-738). Los ligandos endógenos también incluyen metabolitos con niveles aumentados resultantes de mutaciones en enzimas metabólicas clave en cáncer de riñón tales como lactato, glutatión, quinurenina como describen Minton, DR y Nanus, DM (*Nature Reviews, Urology*, Vol. 12, 2005).
- 30
- 35

La especificidad de la unión de un aptámero a un ligando puede definirse en términos de las constantes de disociación ( $K_d$ ) comparativas del aptámero para su ligando en comparación con la constante de disociación del aptámero para moléculas no relacionadas. Por lo tanto, el ligando es una molécula que se une al aptámero con mayor afinidad que al material no relacionado. Típicamente, la  $K_d$  para el aptámero con respecto a su ligando será al menos aproximadamente 10 veces menor que la  $K_d$  para el aptámero con moléculas no relacionadas. La  $K_d$  puede ser al menos aproximadamente 20 veces menor, al menos aproximadamente 50 veces menor, al menos aproximadamente 100 veces menor y al menos aproximadamente 200 veces menor.

40

45 Un aptámero tendrá típicamente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Más comúnmente, un aptámero tendrá entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud.

Los aptámeros que pueden incorporarse como parte del ribointerruptor y cribarse por métodos de la presente invención pueden ser un aptámero de origen natural, o modificaciones del mismo, o aptámeros que se diseñan *de novo* o se criban sintéticamente a través de la evolución sistémica de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX). Los ejemplos de aptámeros que se unen a ligandos de molécula pequeña incluyen, pero no se limitan a teofilina, dopamina, sulforrodamina B y celobiosa-kanamicina A, lividomicina, tobramicina, neomicina B, viomicina, cloranfenicol, estreptomycin, citocinas, moléculas de superficie celular y metabolitos.

50

55 Para una revisión de aptámeros que reconocen moléculas pequeñas, véase, p. ej., Famulok, *Science* 9:324-9 (1999) y McKeague, M. y DeRosa, M.C. *J. Nuc. Aci.* 2012. El aptámero también puede ser un polinucleótido complementario.

El aptámero se puede cribar previamente respecto a la unión a un ligando de molécula pequeña particular *in vitro*. Tales métodos para diseñar aptámeros incluyen, por ejemplo, SELEX. Los métodos para diseñar aptámeros que se unen selectivamente a una molécula pequeña usando SELEX se describen en, p. ej., las patentes de EE. UU. N.º 5,475,096, 5,270,163, y Abdullah Ozer, et al. *Nuc. Aci.* 2014. Las modificaciones del procedimiento SELEX se describen en las patentes de EE. UU. N.º 5,580,737 y 5,567,588.

60

65 Las técnicas de selección previas para identificar aptámeros generalmente implican preparar un gran conjunto

de moléculas de ADN o ARN de la longitud deseada que contienen una región que está aleatorizada o mutagenizada. Por ejemplo, un conjunto de oligonucleótidos para la selección de aptámeros podría contener una región de 20-100 nucleótidos aleatorizados flanqueados por regiones de secuencia definida que son de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud y útiles para la unión de cebadores por PCR. El conjunto de oligonucleótidos se amplifica usando técnicas de PCR convencionales, u otros medios que permitan la amplificación de secuencias de ácido nucleico seleccionadas. El conjunto de ADN se puede transcribir *in vitro* para producir un conjunto de transcritos de ARN cuando se desea un aptámero de ARN. El conjunto de oligonucleótidos de ARN o ADN se somete a continuación a una selección basada en su capacidad para unirse específicamente al ligando deseado. Las técnicas de selección incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, aunque se puede usar cualquier protocolo que permita la selección de ácidos nucleicos basándose en su capacidad para unirse específicamente a otra molécula. Las técnicas de selección para identificar aptámeros que se unen a moléculas pequeñas y funcionan dentro de una célula pueden implicar métodos de cribado basados en células. En el caso de la cromatografía de afinidad, los oligonucleótidos se ponen en contacto con el ligando diana que se ha inmovilizado sobre un sustrato en una columna o sobre perlas magnéticas. El oligonucleótido se selecciona preferiblemente para la unión al ligando en presencia de concentraciones de sal, temperaturas y otras condiciones que imitan condiciones fisiológicas normales. Los oligonucleótidos en el conjunto que se unen al ligando son retenidos en la columna o perla, y las secuencias que no se unen son arrastradas por lavado. Los oligonucleótidos que se unen al ligando después se amplifican (después de la transcripción inversa si se utilizaron transcritos de ARN) por PCR (normalmente después de la elución). El procedimiento de selección se repite en las secuencias seleccionadas un total de aproximadamente tres a diez rondas iterativas del procedimiento de selección. Los oligonucleótidos resultantes después se amplifican, clonan y secuencian usando procedimientos convencionales para identificar las secuencias de los oligonucleótidos que son capaces de unirse al ligando objetivo. Una vez que se ha identificado una secuencia de aptámero, el aptámero puede optimizarse adicionalmente realizando rondas adicionales de selección partiendo de un conjunto de oligonucleótidos que comprenden una secuencia de aptámero mutagenizada.

El aptámero o biblioteca de aptámeros para usar en la presente invención puede comprender uno o más aptámeros identificados en un cribado de aptámeros *in vitro*.

Los aptámeros identificados en el cribado de aptámeros *in vitro* pueden tener uno o más nucleótidos aleatorizados para crear una biblioteca de aptámeros prospectiva para usar en los métodos de la presente invención.

El exón alternativo

El exón alternativo que es parte del casete de polinucleótido de regulación génica de la presente invención es una secuencia de polinucleótido capaz de ser transcrita a un pre-ARNm y, alternativamente, empalmada en el ARNm del gen diana. El exón alternativo que es parte del casete de regulación génica de la presente invención contiene al menos una secuencia que inhibe la traducción de manera que cuando el exón alternativo se incluye en el ARNm del gen diana, se evita o reduce la expresión del gen diana a partir de ese ARNm. Como mínimo, el exón alternativo contiene un codón de parada (TGA, TAA, TAG) que está en el marco con el gen diana cuando el exón alternativo se incluye en el ARNm del gen diana mediante empalme. El exón alternativo puede comprender, además de un codón de parada, otra secuencia que reduce o impide sustancialmente la traducción cuando el exón alternativo se incorpora mediante empalme en el ARNm del gen diana que incluye, p. ej., un sitio de unión a microARN, que conduce a la degradación del ARNm. El exón alternativo puede comprender una secuencia de unión de miARN que da como resultado la degradación del ARNm. El exón alternativo puede codificar una secuencia de polipéptido que reduce la estabilidad de la proteína que contiene esta secuencia de polipéptido. El exón alternativo puede codificar una secuencia de polipéptido que dirige la proteína que contiene esta secuencia polipeptídica para su degradación.

El nivel basal o de fondo de empalme del exón alternativo puede optimizarse alterando secuencias de potenciador de empalme de exón (ESE) y secuencias de supresor de empalme de exón (ESS) y/o introduciendo secuencias ESE o ESS en el exón alternativo. Tales cambios en la secuencia del exón alternativo se pueden lograr usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitadas a, mutagénesis dirigida al sitio. Alternativamente, los oligonucleótidos de una secuencia deseada (p. ej., que comprenden todo o parte del exón alternativo) pueden obtenerse de fuentes comerciales y clonarse en el casete de regulación génica. La identificación de las secuencias ESS y ESE se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el uso de ESEfinder 3.0 (Cartegni, L. et al. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Research*, 2003, 31(13): 3568-3571) y/u otros recursos disponibles.

El exón alternativo puede ser exógeno al gen diana, aunque puede derivar de una secuencia procedente del organismo en el que se expresará el gen diana. En una realización, el exón alternativo es una secuencia sintética. El exón alternativo puede ser un exón de origen natural. El exón alternativo puede derivar de la totalidad o parte de un exón conocido. En este contexto, "derivado" se refiere a la secuencia que contiene el

exón alternativo que es sustancialmente homóloga a un exón de origen natural, o una parte del mismo, pero puede contener varias mutaciones, por ejemplo, para introducir un codón de parada que estará en el marco con la secuencia del gen indicador diana, o para introducir o eliminar un potenciador de empalme de exón, y/o introducir eliminar un supresor de empalme de exón. En una realización, el exón alternativo deriva del exón 2 del gen de dihidrofolato reductasa humano (DHFR), exón 5 del tumor de Wilms 1 humano mutante, exón 16 de la proteína quinasa II delta dependiente de calcio/calmodulina de ratón, o exón 6 de SIRT1.

Secuencias intrónicas 5' y 3'

El exón alternativo está flanqueado por secuencias intrónicas 5' y 3'. Las secuencias intrónicas 5' y 3' que se pueden usar en el casete de regulación génica pueden ser cualquier secuencia que se pueda empalmar fuera del gen diana creando ya sea el ARNm del gen diana o el gen diana que comprende el exón alternativo en el ARNm, dependiendo de la presencia o ausencia de un ligando que se une al aptámero. Cada uno de los intrones 5' y 3' tiene las secuencias necesarias para que se produzca el empalme, es decir, secuencias donadoras de empalme, aceptoras de empalme y de punto de ramificación. Las secuencias intrónicas 5' y 3' del casete de regulación génica pueden derivar de uno o más intrones de origen natural o una parte de los mismos. En una realización, las secuencias intrónicas 5' y 3' derivan de un intrón 2 de beta-globina humana truncado (IVS2Δ). Las secuencias intrónicas 5' y 3' pueden derivar del intrón de ARNm de SV40 (utilizado en el vector pCMV-LacZ de Clontech), intrón 6 del gen de la triosa fosfato isomerasa (TPI) humana (Nott Ajit, et al. *RNA* 2003, 9:6070617) o un intrón del factor IX humano (Sumiko Kurachi et al. *J. Bio. Chem.* 1995, 270(10), 5276), el intrón endógeno del propio gen diana, o cualquier fragmento genómico o intrones sintéticos (Yi Lai, et al. *Hum Gene Ther.* 2006:17(10):1036) que contienen elementos que son suficientes para el empalme regulado (Thomas A. Cooper, *Methods* 2005 (37):331).

El exón alternativo y el ribointerruptor de la presente invención se pueden diseñar para que estén en un intrón endógeno de un gen diana. Es decir, el intrón (o secuencia intrónica sustancialmente similar) se encuentra de forma natural en esa posición del gen diana. En este caso, la secuencia intrónica inmediatamente secuencia arriba del exón alternativo se denomina intrón 5' o secuencia intrónica 5', y la secuencia intrónica inmediatamente secuencia abajo del exón alternativo se denomina intrón 3' o secuencia intrónica 3'. En este caso, el intrón endógeno se modifica para contener una secuencia aceptora de empalme y una secuencia donadora de empalme que flanquean los extremos 5' y 3' del exón alternativo.

Los sitios donador de empalme y aceptor de empalme en el casete de regulación génica de la presente invención pueden modificarse para fortalecerse o debilitarse. Es decir, los sitios de empalme se pueden modificar para estar más cerca del consenso para un donador o aceptor de empalme mediante métodos de clonación estándar, mutagénesis dirigida al sitio y similares. Los sitios de empalme que son más similares al consenso de empalme tienden a promover el empalme y por lo tanto están fortalecidos. Los sitios de empalme que son menos similares al consenso de empalme tienden a impedir el empalme y por lo tanto están debilitados. El consenso para el donador de empalme de la clase más común de intrones (U2) es A/C A G // G T A/G A G T (donde // indica el límite exón/intrón). El consenso para el aceptor de empalme es C A G // G (donde // indica el límite exón/intrón). La frecuencia de nucleótidos particulares en los sitios donador y aceptor de empalme están descritos en la técnica (véase, p. ej., Zhang, M.Q., *Hum Mol Genet.* 1988. 7 (5):919-932). La fuerza de los sitios de empalme 5' y 3' puede ajustarse para modular el empalme del exón alternativo.

Se pueden hacer modificaciones adicionales en los intrones 5' y 3' en el casete de regulación génica para modular el empalme que incluyen modificar, eliminar y/o añadir elementos mejoradores de empalme intrónico y/o elementos supresores de empalme intrónico y/o modificar la secuencia de sitio de ramificación.

El intrón 5' se puede modificar para contener un codón de parada que estará en el marco con el gen indicador. Las secuencias intrónicas 5' y 3' también se pueden modificar para eliminar sitios de cortes crípticos, que se pueden identificar con software disponible públicamente (véase, p. ej., Kapustin, Y. et al. *Nucl. Acids Res.* 2011. 1-8). Las longitudes de las secuencias intrónicas 5' y 3' pueden ajustarse con el fin de, por ejemplo, cumplir con los requisitos de tamaño para construcciones de expresión viral. En una realización, las secuencias intrónicas 5' y 3' tienen independientemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. En una realización, las secuencias intrónicas 5' y 3' tienen independientemente de aproximadamente 125 a aproximadamente 240 nucleótidos de longitud.

Genes indicadores

Los métodos de cribado de la presente invención utilizan un casete de regulación génica que se usa para regular la expresión de un gen diana (p. ej., un gen indicador) que se puede expresar en una célula, tejido u organismo diana. El gen indicador puede ser cualquier gen cuya expresión se puede usar para detectar la interacción específica de un ligando con el aptámero en el casete de regulación génica. En una realización, el gen indicador codifica una proteína fluorescente, incluyendo, p. ej., una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente cian, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente naranja, una proteína

5 fluorescente roja o una proteína fluorescente conmutable. En otra realización, el gen indicador codifica una enzima luciferasa que incluye, p. ej., luciferasa de luciérnaga, luciferasa de Renilla, o luciferasa de Gaussia secretora. En una realización, el gen indicador es  $\beta$ -galactosidasa. En una realización, el indicador es peroxidasa de rábano picante (HRP). En una realización, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en una proteína nuclear, transportador, proteína de membrana celular, proteína de citoesqueleto, receptor, hormona de crecimiento, citocina, molécula de señalización, ARN regulador, anticuerpo y proteínas o péptidos terapéuticos.

10 Construcciones de expresión

La presente invención contempla el uso de un vector recombinante para la introducción en células diana de un polinucleótido que codifica un gen indicador y que contiene el casete de regulación génica de la presente invención. La construcción de ADN recombinante de esta invención puede incluir elementos de ADN adicionales que incluyen segmentos de ADN que proporcionan la replicación del ADN en una célula hospedante y la expresión del gen diana en esa célula en niveles apropiados. El experto en la técnica aprecia que las secuencias de control de la expresión (promotores, potenciadores y similares) se seleccionan basándose en su capacidad para promover la expresión del gen indicador en la célula diana. "Vector" significa un plásmido recombinante, cromosoma artificial de levadura (YAC), minicromosoma, minicírculo de ADN o virus (incluyendo secuencias derivadas de virus) que comprende un polinucleótido que se va a suministrar en una célula hospedante, ya sea in vitro o in vivo. El vector recombinante puede ser un vector viral o una combinación de múltiples vectores virales. Los vectores virales para la expresión mediada por aptámero de un gen indicador en una célula diana son conocidos en la técnica e incluyen vectores adenovirales (AV), vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores retrovirales y lentivirales, y vectores de Herpes simple tipo 1 (HSV1).

25 Métodos para dividir bibliotecas de aptámeros en sub-bibliotecas

Los métodos anteriores pueden comprender además dividir bibliotecas grandes de oligonucleótidos en sub-bibliotecas más pequeñas y enfoques para hacer bibliotecas de plásmidos cribables por ensayo celular de ribointerruptores sintéticos basados en aptámeros. El método para dividir una biblioteca de oligonucleótidos en sub-bibliotecas más pequeñas puede comprender las etapas:

- 30 (a) proporcionar una biblioteca de oligonucleótidos en donde los oligonucleótidos de la biblioteca comprenden múltiples regiones constantes 5' y 3',
- 35 (b) realizar una PCR de dos ciclos utilizando la biblioteca de oligonucleótidos como molde y primeros cebadores y segundos cebadores que son complementarios de las regiones constantes 5' y 3'
- (c) aislar los productos de la PCR de dos ciclos, y
- 40 (d) amplificar por PCR un subconjunto de los productos aislados de la PCR de dos ciclos usando cebadores complementarios de un subconjunto de las regiones constantes 5' y 3' únicas.

La biblioteca de oligonucleótidos puede ser una biblioteca de aptámeros aleatorizados que contienen uno o más nucleótidos aleatorizados. Las secuencias de aptámeros están flanqueadas por una región constante izquierda y derecha, que contienen un sitio de restricción para la clonación posterior.

50 El primer o segundo cebador en la PCR de dos ciclos puede comprender un marcador seleccionado del grupo que consiste en biotina, digoxigenina (DIG), bromodesoxiuridina (BrdU), fluoróforo, un grupo químico, p. ej., grupo tiol, o un grupo químico, p. ej., azidas utilizadas en la química click. Estas moléculas se pueden unir a los oligonucleótidos, y sus moléculas de interacción, tales como estreptavidina o formas modificadas de avidina para biotina, anticuerpos contra DIG o BrdU o fluoróforo, o un segundo grupo tiol para formar disulfuro, grupo alquino para azidas, se pueden inmovilizar sobre una superficie sólida para facilitar el aislamiento de oligonucleótidos marcados.

55 Una vez que una biblioteca de aptámeros se divide en sub-bibliotecas de aptámeros, los aptámeros en una o más sub-bibliotecas se introducen en el casete de polinucleótido de regulación génica para generar una biblioteca de ribointerruptores y se criban según la unión de ligando por los métodos proporcionados en el presente documento.

60 Métodos para dividir bibliotecas de ribointerruptores en sub-bibliotecas

Los métodos anteriores pueden comprender además dividir una biblioteca de ribointerruptores en sub-bibliotecas. Una biblioteca de ribointerruptores como se usa en el presente documento es una biblioteca de plásmidos que comprende un casete de polinucleótido de regulación génica, p. ej., como se describe en el presente documento y en el documento PCT/US2016/016234, que comprende una pluralidad de aptámeros

5 donde los miembros individuales de la biblioteca comprenden secuencias de aptámeros que son diferentes de otros miembros de la biblioteca. En realizaciones, los aptámeros en la biblioteca de ribointerruptores comprenden uno o más nucleótidos aleatorizados. La biblioteca de ribointerruptores plasmídicos puede haber sido generada a partir de una sub-biblioteca de aptámeros creada por los métodos descritos en el presente documento.

El método para dividir la biblioteca de ribointerruptores en sub-bibliotecas comprende las etapas de:

10 (a) introducir una biblioteca de aptámeros en un plásmido que comprende un casete de polinucleótido de regulación génica descrito en el presente documento para hacer una biblioteca de ribointerruptores;

(b) introducir la biblioteca de ribointerruptores en bacterias (p. ej., *E. coli*);

15 (c) recoger clones bacterianos (por ejemplo, escogiendo colonias bacterianas) y extraer ADN plasmídico para obtener sub-bibliotecas de plásmidos de ribointerruptores (denominadas en el presente documento sub-bibliotecas primarias);

20 (d) opcionalmente, generar sub-bibliotecas secundarias de ribointerruptores a partir de una sub-biblioteca de plásmidos primaria de ribointerruptores introduciendo una sub-biblioteca primaria en bacterias, recogiendo clones bacterianos y aislando el ADN plasmídico.

25 Los métodos para introducir secuencias en plásmidos para generar una biblioteca se conocen en la técnica así como lo son los métodos para introducir plásmidos en bacterias y obtener clones bacterianos. Los clones bacterianos que contienen un miembro de la biblioteca de ribointerruptores plasmídicos se pueden recolectar sembrando bacterias y escogiendo colonias individuales. Los plásmidos agrupados de estos clones forman la sub-biblioteca. El número de clones bacterianos recolectados determina el tamaño (número de miembros únicos) de la sub-biblioteca de ribointerruptores y se pueden generar múltiples sub-bibliotecas. Una o más sub-bibliotecas primarias pueden dividirse adicionalmente para crear sub-bibliotecas secundarias para reducir adicionalmente el tamaño de las sub-bibliotecas. Las sub-bibliotecas se criban usando los métodos descritos en el presente documento introduciendo una o más sub-bibliotecas en células eucariotas, exponiendo las células a un ligando de interés, y midiendo la expresión del gen indicador del casete de polinucleótido de regulación génica. El aumento en la expresión del gen indicador en respuesta al ligando indica que uno o más miembros de la biblioteca comprenden un aptámero que se une al ligando en el contexto del ribointerruptor. Por lo tanto, el tamaño de la sub-biblioteca que se puede cribar puede determinarse por la sensibilidad del ensayo para medir la expresión del gen indicador. Una sub-biblioteca puede comprender de aproximadamente 50 a aproximadamente 600 miembros únicos (aunque algunos miembros pueden repetirse en otras sub-bibliotecas).

40 Debe entenderse y esperarse que un experto en la técnica puede variar los principios de la invención descritos en el presente documento. Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

#### Ejemplo 1

45 Cribado basado en células de mamífero para aptámero/ligandos usando ribointerruptores reguladores de genes basados en empalme.

#### Procedimientos:

50 Construcción de ribointerruptores: Los ribointerruptores se construyeron como se describe en el documento PCT/US2016/016234 (en particular, los Ejemplos 3 a 6). Se sintetizó una secuencia de intrón de beta-globina humana troncada y se insertó en la secuencia codificante de un gen de luciferasa de luciérnaga. Se sintetizó un exón 2 de DHFR humana mutante y se insertó en el medio de esta secuencia de intrón de beta-globina troncada usando la estrategia de clonación de Golden Gate. Se sintetizaron aptámeros que incluyen xpt-G/A<sup>1</sup>, ydhl-G/A<sup>2</sup>, yxj<sup>3</sup>, add<sup>4</sup>, gdg6-G/A<sup>5</sup> como oligonucleótidos ("oligos") con 4 nucleótidos protuberantes en el extremo 5' que son complementarios de dos sitios Bsal diferentes individualmente (IDT), se reasociaron y se ligaron al vector mDHFR-Luci-aceptor digerido con Bsal.

60 Transfección: 3,5 x 10<sup>4</sup> células HEK 293 se sembraron en una placa de fondo plano de 96 pocillos el día antes de la transfección. Se añadió ADN plasmídico (500 ng) a un tubo o a una placa de fondo en U de 96 pocillos. Por separado, se añadió reactivo TransIT-293 (Mirus; 1,4 µl) a 50 µl de medio Optimem I (Life Technologies), y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación, se añadieron 50 µl de este reactivo de transfección diluido al ADN, se mezclaron y se incubaron a TA durante 20 min. Finalmente, se añadieron 7 µl de esta solución a un pocillo de células en la placa de 96 pocillos.

65 Ensayo de luciferasa de luciérnaga de células cultivadas: 24 horas después del cambio de medio, las placas

se retiraron de la incubadora, y se equilibraron a TA durante varios minutos en un banco de laboratorio, luego se aspiraron. Se añadió tampón de lisis Glo (Promega, 100 µl, TA), y las placas se mantuvieron a TA durante al menos 5 minutos. A continuación, se mezclaron los contenidos del pocillo mediante trituración de 50 µl, y se mezclaron 20 µl de cada muestra con 20 µl de reactivo Bright-Glo (Promega) que se había diluido al 10% en tampón de lisis Glo. Se espaciaron 96 pocillos en una placa opaca blanca de 384 pocillos. Después de una incubación de 5 min a TA, se midió la luminiscencia usando una máquina Tecan con un tiempo de lectura de 500 ms. La actividad de luciferasa se expresó como unidad relativa de luz media (URL)±S.D., y la tasa de inducción se calculó como la actividad de luciferasa obtenida con tratamiento con guanina dividida por la actividad de luciferasa obtenida sin tratamiento con guanina.

10

Resultados:

Comenzando con luciferasa como un gen indicador, se creó una plataforma de expresión génica insertando un intrón de β-globina humana en el medio de la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga y un exón 2 de DHFR humana que contiene codón de parada en la parte de intrón. La expresión del gen indicador se controla así mediante la inclusión o exclusión del exón de mDHFR que contiene un codón de parada que está en el marco con el gen indicador. En este sistema, una estructura de horquilla en el ARNm formada por el sitio de unión de U1 y una secuencia complementaria insertada bloquea la inclusión del exón de mDHFR, permitiendo por lo tanto la expresión del gen diana (Figura 1a). Para hacer la formación de estructura de horquilla regulable, por lo tanto la expresión del gen diana controlable por moléculas pequeñas, los autores de la invención injertaron aptámeros sintéticos (teofilina) o aptámeros naturales (aptámeros xpt-G/A, yxj, ydhl-A/G, add-A/G) o aptámeros híbridos gdg6-G/A) a esta plataforma de regulación génica basada en empalme entre el sitio de unión de U1 y su secuencia complementaria, y se generaron ribointerruptores sintéticos que regulan la expresión génica en células de mamífero. Usando su casete de regulación génica basado en empalme e insertando diferentes aptámeros en su construcción de ribointerruptor sintética, demostraron diferentes respuestas funcionales al ligando en el contexto de células de mamífero. Los ribointerruptores con aptámeros de guanina responden a la guanina así como a la guanosina como se muestra en la Figura 1b. El ribointerruptor xpt-guanina, xpt-G17 (descrito en el documento PCT/US2016/016234, véase, p. ej., SEQ ID NO: 15,) produjo un alto intervalo dinámico de inducción de la expresión del gen indicador en respuesta al ligando con tratamiento con su ligando natural.

Aunque los ribointerruptores basados en aptámeros naturales tienen un alto intervalo dinámico en la regulación de la expresión génica en células de mamífero, la naturaleza de los ligandos para esos aptámeros naturales limita su aplicabilidad *in vivo*. Aprovechando su plataforma de regulación génica altamente dinámica con ribointerruptores, primero eligieron una lista de análogos de guanina que tienen diferentes grupos químicos en la posición N2 para ensayar sus actividades en el ribointerruptor xpt-G17. Como se muestra en la Figura 1c, a una concentración de 500 µM, varios compuestos de N2 indujeron actividad de la luciferasa en células con la construcción xpt-G17, siendo la N2-fenoxiacetil-guanina la más potente (tasa de inducción de 1303) como se muestra en la Figura 1d. Para expandir la lista de compuestos para usar como ligandos potenciales, se usó la biblioteca Prestwick (una colección de 1280 fármacos clínicamente aprobados) a 100 µM para cribar ligandos óptimos para activar aptámeros conocidos en el contexto de células de mamífero. Como se muestra en la Figura 1e a partir de un cribado preliminar, el ribointerruptor de guanina xpt-G17 respondió no solo a la guanina, sino también a la 8-azaguanina, Nadida, N6-metiladenosina, propionato de testosterona, 5'-monofosfato de adenosina monohidrato, anfotericina B, tioguanina, tiloxapol, progesterona y acetato de clormadinona como se muestra en la Figura 1e, así como a varios otros compuestos listados en la Tabla 1. Es interesante que algunos de estos compuestos que mostraban actividades en el ribointerruptor xpt-G17 son estructuralmente muy diferentes de la guanina o guanosina. La biblioteca Prestwick se cribó además con otros 8 ribointerruptores de purina, y se obtuvo una serie de compuestos que pueden activar los ribointerruptores para inducir la actividad de la luciferasa (Tabla 1). Estos resultados demuestran el uso importante del sistema de ribointerruptor en el descubrimiento de ligandos óptimos potenciales para aptámero conocido en el entorno celular, resaltando además la importancia de generar aptámeros en el contexto de las células dentro de las cuales se requerirá que funcione el ribointerruptor.

Tabla 1.

55

Ribointerruptor	Nombre del compuesto	Tasa de inducción
xpt-G17	8-Azaguanina	131,0
xpt-G17	Azatioprina	6,2
xpt-G17	Cinarizina	3,5
xpt-G17	Maleato de pimetixeno	4,7
xpt-G17	N6-metiladenosina	30,7
xpt-G17	Tioguanosina	21,0
xpt-G17	5'-Monofosfato de adenosina monohidrato	28,4
xpt-G17	Anfotericina B	21,5

ES 2 971 123 T3

Ribointerruptor	Nombre del compuesto	Tasa de inducción
xpt-G17	Propionato de testosterona	29,0
xpt-G17	Haloprogina	5,1
xpt-G17	Idebenona	3,3
xpt-G17	Zotepina	4,3
xpt-G17	Progesterona	12,0
xpt-G17	Tenatoprazol	3,2
xpt-G17	Sal de maleato de acetopromazina	4,5
xpt-G17	Etofenamato	7,5
xpt-G17	Mercaptopurina	3,6
xpt-G17	Avermectina B 1	4,0
xpt-G17	Hidrocloruro de promazina	3,7
xpt-G17	Nadida	40,9
xpt-G17	Tartrato de trimeprazina	4,9
xpt-G17	Hidrocloruro de prometazina	5,3
xpt-G17	Tiloxapol	16,2
xpt-G17	Acetato de clormadinona	10,3
xpt-G17	Pamoato de pirvinio	5,1
gdg6-A8	8-Azaguanina	305,9
gdg6-A8	Cimetidina	3,0
gdg6-A8	Azatioprina	19,9
gdg6-A8	Hidrocloruro de diperodón	3,0
gdg6-A8	Maleato de pimetixeno	9,2
gdg6-A8	Tioguanosina	20,1
gdg6-A8	Sal de maleato de acetopromazina	8,6
gdg6-A8	Mercaptopurina	17,2
gdg6-A8	Dihidrocloruro de opipramol	3,1
gdg6-A8	Hidrocloruro de promazina	12,6
gdg6-A8	Sal de maleato de metotrimprazina	5,0
gdg6-A8	Dienestrol	4,3
gdg6-A8	Sal de maleato de trimipramina	5,3
gdg6-A8	Tartrato de trimeprazina	8,7
gdg6-A8	Hidrocloruro de prometazina	4,8
gdg6-A8	Vorinostat	6,4
gdg6-A8	Metiazol	3,8
yxj-A6	8-Azaguanina	55,6
yxj-A6	Azatioprina	6,6
yxj-A6	Maleato de pimetixeno	4,9
yxj-A6	Tioguanosina	10,2
yxj-A6	Sal de maleato de acetopromazina	3,1
yxj-A6	Mercaptopurina	10,0
yxj-A6	Hidrocloruro de promazina	6,6
yxj-A6	Sulfaquinoxalina sódica	3,4
yxj-A6	Sal de maleato de trimipramina	3,3
yxj-A6	Tartrato de trimeprazina	7,0
yxj-A6	Hidrocloruro de prometazina	7,9
yxj-A6	Mesilato de pirlindol	3,2
add-A6	8-Azaguanina	22,1
add-A6	Azatioprina	6,5
add-A6	Maleato de pimetixeno	4,2
add-A6	Tioguanosina	5,9
add-A6	Sal de maleato de acetopromazina	3,5
add-A6	Mercaptopurina	15,0
add-A6	Dihidrocloruro de opipramol	4,3
add-A6	Hidrocloruro de promazina	10,5
add-A6	Sulfaquinoxalina sódica	3,3
add-A6	Hidrocloruro de terazosina	3,5
add-A6	Sal de maleato de trimipramina	3,4
add-A6	Tartrato de trimeprazina	4,0
add-A6	Hidrocloruro de prometazina	4,5
add-A6	Citrato de deptropina	3,3
add-A6	Cloruro de alcuronio	4,2

ES 2 971 123 T3

Ribointerruptor	Nombre del compuesto	Tasa de inducción
ydhl-A6	Hidroclorotiazida	3,3
ydhl-A6	8-Azaguanina	3,7
ydhl-A6	Hidrocloruro de ticlopidina	3,1
ydhl-A6	Sal de citrato de alverina	4,2
ydhl-A6	Vincamina	3,3
ydhl-A6	Idebenona	3,5
ydhl-A6	Pepstatina A	4,0
ydhl-A6	Modafinilo	3,8
ydhl-A6	Benperidol	3,1
ydhl-A6	Digoxigenina	4,5
ydhl-A6	Digoxigenina	3,3
ydhl-A6	Hidrocloruro de moricizina	10,3
ydhl-A6	Hidrocloruro de pivmecilinam	3,2
ydhl-A6	Hidrocloruro de piperidolato	3,4
ydhl-A6	Oxaprozina	3,4
ydhl-A6	Imidurea	4,3
ydhl-A6	Hidrocloruro de mecamilamina	3,2
xpt-A8	8-Azaguanina	95,1
xpt-A8	Azatioprina	5,9
xpt-A8	Maleato de pimetixeno	3,3
xpt-A8	Tioguanosina	11,8
xpt-A8	Mercaptopurina	3,4
xpt-A8	Hidrocloruro de promazina	4,1
xpt-A8	Hidrocloruro de prometazina	5,4
gdg6-G8	8-Azaguanina	42,3
gdg6-G8	Azatioprina	16,2
gdg6-G8	Maleato de pimetixeno	5,1
gdg6-G8	Tioguanosina	15,9
gdg6-G8	Anfotericina B	3,8
gdg6-G8	Sal de maleato de acetopromazina	3,2
gdg6-G8	Mercaptopurina	16,2
gdg6-G8	Hidrocloruro de promazina	6,2
gdg6-G8	Sal de maleato de trimipramina	3,3
gdg6-G8	Tartrato de trimeprazina	6,2
gdg6-G8	Hidrocloruro de prometazina	6,5
gdg6-G8	Sulfato de penbutolol	3,3
gdg6-G8	Vorinostat	10,2
gdg6-G8	Metiazol	3,3
gdg6-G8	Estriol	4,3
add-G6	8-Azaguanina	47,9
add-G6	Niclosamida	3,0
add-G6	Azatioprina	11,4
add-G6	Linestrenol	3,8
add-G6	Hidrocloruro de R(-)apomorfina hemihidrato	3,4
add-G6	Danazol	3,7
add-G6	Camptotecina (S, +)	5,7
add-G6	Cinarizina	3,6
add-G6	Maleato de pimetixeno	6,6
add-G6	Dihidrocloruro de flunarizina	4,7
add-G6	N6-metiladenosina	20,8
add-G6	Tioguanosina	7,9
add-G6	5'-Monofosfato de adenosina monohidrato	9,4
add-G6	Hidrocloruro de bepridilo	4,4
add-G6	Anfotericina B	10,7
add-G6	Propionato de testosterona	8,8
add-G6	Haloprogina	5,9
add-G6	Idebenona	6,7
add-G6	Sulfosalicilato de meclociclina	3,4
add-G6	Progesterona	6,0
add-G6	Sal de maleato de acetopromazina	5,0
add-G6	Etofenamato	5,1



## ES 2 971 123 T3

Ribointerruptor	Nombre del compuesto	Tasa de inducción
add-G6	Mercaptopurina	14,3
add-G6	Hidrocloruro de benzamilo	3,0
add-G6	Avermectina B 1	11,8
add-G6	Hidrocloruro de promazina	5,4
add-G6	Nadida	30,8
add-G6	Sal de maleato de trimipramina	3,4
add-G6	Tartrato de trimeprazina	6,2
add-G6	Simvastatina	6,2
add-G6	Hidrocloruro de prometazina	6,7
add-G6	Hidrocloruro de protriptilina	5,0
add-G6	Acetato de clormadinona	26,1
add-G6	Acetato de nomegestrol	3,5
add-G6	Pamoato de pirvinio	15,8
add-G6	Nitrato de sertaconazol	6,5
add-G6	Vorinostat	3,6
ydhl-G8	Sulfaguanidina	13,9
ydhl-G8	8-Azaguanina	35,6
ydhl-G8	N6-metiladenosina	10,7
ydhl-G8	Tioguanosina	7,5
ydhl-G8	5'-Monofosfato de adenosina monohidrato	5,9
ydhl-G8	Anfotericina B	6,5
ydhl-G8	Hidrocloruro de tetracaína	3,6
ydhl-G8	Sal de maleato de acetopromazina	3,9
ydhl-G8	Hidrocloruro de azelastina	3,0
ydhl-G8	Etofenamato	4,8
ydhl-G8	Mercaptopurina	3,6
ydhl-G8	Hidrocloruro de promazina	5,2
ydhl-G8	Nadida	11,7
ydhl-G8	Tartrato de trimeprazina	5,0
ydhl-G8	Acetato de clormadinona	10,4
ydhl-G8	Pamoato de pirvinio	5,5
ydhl-G8	Vorinostat	3,0

Las secuencias para los ribointerruptores usados en el cribado de la biblioteca Prestwick se proporcionan a continuación con las secuencias de tallo en letras mayúsculas, y las secuencias de aptámero en letras minúsculas:

5

xpt-A8 (SEQ ID NO: 1):

GTAATGTataatcgctggatagccacgcaagtttctaccgggaccgtaaatgtccgattACATTAC add-G6 (SEQ ID NO: 2):

10 GTAATGTGtataatcctaataatgatatggttgggagtttctaccaagagcctaaactcttgactaCACATTAC add-A6 (SEQ ID NO: 3):

GTAATGTGtataatcctaataatgatatggttgggagtttctaccaagagcctaaactcttgattaCACATTAC gdg6-A8 (SEQ ID NO: 4):

15 GTAATGTacagggtagcataatgggctactgaccccgccgggaaacctattcccgattACATTAC gdg6-G8 (SEQ ID NO: 5):

GTAATGTacagggtagcataatgggctactgaccccgccgggaaacctattcccgactACATTAC

Ydhl-G8 (SEQ ID NO: 6):

20 GTAATGTataacctcaataatggttggaggtgtctaccaggaaccgtaaaatcctgactACATTAC

Ydhl-A6 (SEQ ID NO: 7):

25 GTAATGTGtataacctcaataatggttggaggtgtctaccaggaaccgtaaaatcctgattaCACATTAC yxj-A6 (SEQ ID NO: 8):

GTAATGTGtatatgatcagtaaatggtctgattgttctacctagtaaccgtaaaaaactagattaCACATTAC

Ejemplo 2

30 Diseño y síntesis de biblioteca de aptámeros.

Procedimiento

5 Para generar una biblioteca de aptámeros, se aleatorizaron nucleótidos en posiciones en el aptámero que se identifican a partir de la estructura cristalina<sup>6,7</sup> como potencialmente implicados en la unión de ligando. Con el fin de facilitar la construcción de aptámeros en ribointerruptores, la región de aptámero estaba flanqueada por regiones constantes con sitios de corte de enzima de restricción de tipo IIs (p. ej., Bsal). Estos oligonucleótidos Ultramer de 153 pb que contienen la secuencia de aptámero con bases aleatorizadas se sintetizaron mediante IDT:

10  
 GACTTCGGTCTCATCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATGTA  
 TANNNGCGTGGATATGGCACGCNNGNNNNNCNCCGGGCACCGTAAATGTCCGACT  
 ACATTACGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGAAGAGACCAGACGG (N representa

15 nucleótidos aleatorios) (SEQ ID NO: 9). Para generar más diversidad de secuencias en la biblioteca de aptámeros, se pueden aleatorizar bases en más posiciones. También se puede usar una secuencia completamente aleatoria para generar la biblioteca de aptámeros.

Resultados

20 Como se describe en el Ejemplo 1, los autores de la invención han construido con éxito ribointerruptores sintéticos que regulan la expresión de genes de mamífero en respuesta al tratamiento con ligando de molécula pequeña. Uno de los ribointerruptores xpt-G17 contiene el aptámero de guanina xpt-G en el casete de expresión génica basado en empalme. Usando luciferasa como un gen indicador, se logró un alto intervalo dinámico de regulación génica en respuesta al tratamiento con guanina, con una tasa de inducción de 2000 a una alta concentración de guanina. Este intervalo dinámico sin precedentes de actividad de regulación génica por las construcciones de empalme alternativo mediadas por aptámero/ligando proporciona un sistema para cribar aptámeros contra un ligando deseado en células de mamífero, o cribar ligandos que se unen y activan aptámeros conocidos.

25  
 30 Se seleccionó el xpt-G17 como una plataforma para construir una biblioteca de ribointerruptores de inicio. La configuración de la secuencia de oligonucleótidos se diseñó para reemplazar el aptámero de guanina xpt-G original en las siguientes etapas de clonación. Se aleatorizaron los nucleótidos en el aptámero de guanina xpt-G en posiciones que se sabe que son críticas para la unión de guanina basándose en el análisis de cristalografía. Inicialmente, se aleatorizaron 10 posiciones, lo que generó una biblioteca de 1.048.576 secuencias de aptámero. Cuando se aleatorizan más de 10 posiciones, se pueden generar bibliotecas mayores que 10<sup>6</sup> secuencias. Aunque aquí se usó selectivamente la secuencia de cadena principal de aptámero de guanina xpt-G para aleatorizar, se puede usar un enfoque similar para generar bibliotecas de aptámeros con otros aptámeros conocidos, o incluso secuencias completamente aleatorias sin ligandos conocidos. Aunque aquí se eligió xpt-G17 como plataforma, es importante señalar que los ribointerruptores con diferentes aptámeros, o ribointerruptores basados en mecanismos distintos del empalme también se pueden usar como  
 40 plataforma de partida para generar secuencias de aptámeros aleatorizadas.

Ejemplo 3

45 División de la biblioteca grande de aptámeros aleatorizados en sub-bibliotecas más pequeñas de aptámeros.

Procedimientos

50 Oligonucleótidos (oligos): El conjunto de cebadores JF o JR tienen la secuencia de la parte 3' complementaria de las regiones constantes en los oligos aptámeros sintetizados y la secuencia de la parte 5' que contiene secuencias de oligos de 20 meros aleatorias. El conjunto de cebadores F o R es complementario de las secuencias de oligos de 20 meros aleatorias en los cebadores JF o JR. Todos los cebadores se sintetizan en IDT. Los cebadores JF se marcaron con biotina en el extremo 5' (IDT). Los oligos sintetizados se suspendieron en agua exenta de DNasa y de RNasa hasta 100 µM como solución madre, y se diluyeron a la concentración deseada y se cuantificaron usando una máquina NanoDrop o método OliGreen (ThermoFisher).

55 Amplificación por PCR de dos ciclos: Para añadir el oligo-marcador biotinilado, se realizó amplificación por PCR de dos ciclos usando el kit de PCR Pfx Platinum siguiendo el protocolo del fabricante en un volumen de reacción de 10 µl. Los moldes de oligo se usaron a los números de copias deseados en la reacción de PCR (1 a 5 copias por secuencia de oligo en la biblioteca de aptámeros). Para el primer ciclo de amplificación, solo se incluyeron cebadores JR inversos. La amplificación se llevó a cabo a 94°C durante 2 minutos, después a 94°C durante 10 segundos, reasociación con un programa de rampa de temperatura decreciente (*touchdown*) de 66°C a 52°C descendiendo a 0,5°C por minuto. A continuación, la reacción de polimerasa se extendió a 68°C

durante 20 segundos seguido de enfriamiento hasta 4°C. Después se añadieron 10 µl de mezcla de PCR sin molde pero que contenía cebadores directos biotinilados (biotina-JF) al tubo de PCR del primer ciclo para el segundo ciclo de amplificación usando las mismas etapas de PCR. Los productos de PCR estaban listos para

5

Aislamiento de oligonucleótidos biotinilados (oligos): Se preparó tampón de unión y lavado 2x (tampón BW) de tampón TE 1x (Ambion) con NaCl 2 M. La estreptavidina de Dynabeads M-270 (ThermoFisher) (SA-perlas) se bloqueó con solución de ARNt de levadura 20 µM (Ambion) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se lavó con tampón BW 1x dos veces, y se resuspendió en el mismo volumen de tampón BW 2x que el volumen inicial de perlas utilizadas. Se añadieron 50 µl de estas perlas tratadas a los productos de PCR junto con 100 µl de tampón BW 2x y 30 µl de agua. Los 200 µl de mezcla de oligos biotinilados y SA-perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos, después las perlas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos, se enfriaron inmediatamente sobre hielo y se lavaron una vez con tampón BW 1x, dos veces con agua durante 5 minutos siguiendo el protocolo del fabricante. La solución de lavado se retiró tanto como fue posible, y las perlas lavadas estaban listas para la reacción de PCR.

10

15

PCR específicas de marcador de secuencia de oligo: Se añadieron perlas con productos de PCR biotinilados a un total de 50 µl de mezcla de PCR usando el kit de PCR de Platinum Pfx. Los cebadores son una mezcla del conjunto de cebadores F y R. La PCR se precalentó a 94°C durante 2 minutos, se sometió a 28 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 62°C durante 30 segundos, 68°C durante 20 segundos, y una extensión adicional a 68°C durante 2 min. El producto de PCR se enfrió a 12°C y estaba listo para la segunda ronda de PCR. Para la segunda ronda de amplificación por PCR, se usaron 1 µl del producto de PCR de la primera ronda de PCR como molde, y se usó un solo par de cebadores F y R para amplificar moldes marcados con las secuencias complementarias. La reacción de PCR se precalentó a 94°C, y se amplificó con 25 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, 68°C durante 20 segundos, y una extensión adicional a 68°C durante 2 minutos.

20

25

#### Resultados

30

Aunque la selección *in vitro* que usa la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX)<sup>8,9</sup> se ha aplicado extensamente para cribar bibliotecas grandes de aptámeros normalmente con 10<sup>13</sup> a 10<sup>14</sup> secuencias para generar numerosos aptámeros contra una amplia variedad de ligandos que incluyen metabolitos, cofactores de vitaminas, iones metálicos, proteínas e incluso células<sup>10</sup>, todavía no se han desarrollado métodos para cribados basados en células de dichas bibliotecas grandes de aptámeros aleatorizados. Además, pocos aptámeros generados por SELEX han demostrado ser eficaces en un entorno celular, lo que pone de relieve la importancia de cribar aptámeros en el entorno celular donde se requerirán para funcionar. Con el fin de que los aptámeros seleccionados funcionen dentro de las células, la unión del aptámero específico a su ligando debe tener una consecuencia funcional, que no puede ensayarse a través de SELEX, que selecciona aptámeros basándose únicamente en la unión del ligando en condiciones *in vitro*. Un desafío del desarrollo de cribados basados en células de mamífero para aptámeros es el bajo intervalo dinámico regulador de genes de ribointerruptores basados en aptámeros en respuesta al tratamiento con ligando. Además de esta limitación fundamental, la eficiencia intrínseca de transducción génica baja en células de mamífero impone otra barrera al cribado de bibliotecas mayores que 10<sup>5</sup> secuencias. Sin embargo, los autores de la invención desarrollaron ribointerruptores sintéticos que pueden generar la inducción de hasta varios miles de veces de la expresión génica tras el tratamiento con ligando. Este alto intervalo dinámico de regulación génica proporciona la base de un sistema basado en células para cribar aptámero/ligandos. Con el fin de seleccionar aptámeros en células eucariotas de bibliotecas de aptámeros grandes que tienen alta diversidad de secuencias, la presente invención proporciona múltiples estrategias y enfoques para partir/dividir bibliotecas de aptámeros grandes en sub-bibliotecas más pequeñas que pueden clonarse en casete de ribointerruptor para generar bibliotecas de plásmidos que se pueden cribar por medio de ensayos basados en células de mamífero.

35

40

45

50

La estrategia de dividir bibliotecas grandes de aptámeros es añadir primero un par de secuencias únicas en los extremos tanto 5' como 3' de las secuencias de oligos de aptámeros aleatorizados sintetizadas (como se describe en el Ejemplo 2). En la segunda etapa de esta estrategia, las secuencias de aptámeros unidas (etiquetadas/marcadas) con secuencias de oligos únicas pueden amplificarse usando un solo par de cebadores complementarios de cada par de marcadores de secuencia, generando así diferentes sub-bibliotecas de aptámeros (Figura 3a). Este procedimiento de dos etapas de marcado y PCR se puede iterar para dividir la biblioteca a los tamaños deseados.

55

60

Para unir pares de secuencias únicos al molde, los autores de la invención han desarrollado múltiples enfoques (Figura 3b). Un enfoque es utilizar la PCR para incorporar secuencias únicas a los moldes (enfoque de PCR). Otros enfoques incluyen ligar el marcador de secuencia monocatenaria a un molde monocatenario usando la ARN ligasa T4 y ligar mediante ADN ligasa T4 marcadores de secuencia bicatenaria a moldes bicatenarios que se generan por amplificación por PCR de moldes de oligonucleótidos monocatenarios (enfoque de ligado). Los

65

autores de la invención han desarrollado y ensayado un enfoque de PCR de dos ciclos (Figura 3c), y actualmente están en un proceso de ensayar los enfoques de ligado para añadir marcadores de secuencias únicas.

5 Para usar el enfoque de PCR para unir marcadores de secuencia para generar una biblioteca marcada de aptámeros, se diseñó un conjunto de cebadores de PCR (JF y JR). Este conjunto de cebadores contiene la secuencia de marcador en la parte 5' de los cebadores, y en la parte 3' de los cebadores, la secuencia que es complementaria de la región constante en los oligos aptámeros sintetizados. Con el fin de evitar la heterogeneidad generada por la PCR<sup>11</sup> convencional de múltiples ciclos usando números de copias altos de  
 10 moldes, se desarrolló una PCR de dos ciclos para unir el marcador de secuencia en un extremo del molde en cada ciclo (Figura 3c). En esta PCR de dos ciclos, el número de copias de los moldes de oligos aleatorizados se mantuvo mínimo para disminuir la posibilidad de que cada molde se uniera con más de un par de secuencias de marcadores. Con el fin de aislar y purificar los moldes marcados, se marcaron cebadores JF con moléculas de biotina, de manera que se pueden usar perlas magnéticas de estreptavidina para separar los moldes  
 15 marcados y biotinilados del resto de los componentes de reacción (Figura 3d). Debido al bajo número de copias de moldes con el que se empezó el marcado por PCR, los moldes marcados y biotinilados aislados se amplificaron y expandieron por PCR usando una mezcla de un conjunto de cebadores (cebadores J y F) que son específicos para las secuencias de marcadores unidas a los moldes, generando la biblioteca de aptámeros que tienen un par único de secuencias en los extremos (biblioteca marcada de aptámeros aleatorizados). Este  
 20 producto de PCR sirve entonces como molde para la PCR con un solo par de cebadores J y R para amplificar cada molde marcado, generando así las sub-bibliotecas de la biblioteca de aptámeros original.

En un estudio piloto donde se usaron 2 cebadores JF marcados con biotina (JF1 y JF2) y 8 cebadores JR inversos (JR1 a JR8), dio como resultado un total de 16 pares únicos de marcadores de secuencia. Después  
 25 de generar la biblioteca marcada por PCR con moldes con 1, 2,3 o 4,6 copias que representan 63%, 90% o 99% de la biblioteca de aptámeros aleatorizados inicial, respectivamente, se usaron diferentes cebadores para ensayar la estrategia de división. Como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 3e, los moldes marcados se amplificaron mediante cebadores complementarios de la región constante (cebadores universales) en el aptámero, que amplifican todos los moldes en la biblioteca. Cuando se usó un solo par de cebadores (F1 y R1)  
 30 que son específicos para las secuencias de marcadores añadidas (panel medio), pero no el par de cebadores (F3 y R1) que no se incluyeron en el marcado (panel derecho), los moldes marcados se amplificaron en una cantidad mucho menor en comparación con el producto amplificado con cebador universal, lo que indica que solo se amplificó una parte (1/16) de la biblioteca. Por lo tanto, la biblioteca original se dividió en sub-bibliotecas más pequeñas.

35 Ejemplo 4

La sensibilidad del ensayo basado en células para el cribado de bibliotecas.

40 Procedimientos:

Construcciones de ADN: Las construcciones de ADN de plásmido que contenían ribointerruptor xpt-G17 se diluyeron en la construcción de ADN SR-Mut en relaciones diferente de estas dos construcciones de ADN. Las construcciones de ADN de plásmidos mixtas de G17 y SR-mut se transfectaron a continuación a células HEK  
 45 293. La transfección y el ensayo de luciferasa se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados:

La sensibilidad del ensayo basado en células para el cribado de bibliotecas determina cuán complejo o cuán grande puede ser el tamaño de la biblioteca de plásmidos de aptámero-ribointerruptor con el fin de que al menos 1 acierto positivo sobresalga del resto de la biblioteca en el cribado. El ensayo puede ser para la actividad de luciferasa, intensidad de fluorescencia de proteína fluorescente o liberación de hormona de crecimiento/citocina, dependiendo del gen indicador elegido, y los elementos genéticos pueden suministrarse  
 50 ya sea por transfección transitoria o por transducción viral, p. ej. AAV, adenovirus, lentivirus, etc.

Aquí, se eligió la transfección transitoria para suministrar ADN plasmídico, y se usó luciferasa de luciérnaga como gen indicador usando la construcción xpt-G17 como vector de control de ribointerruptor positivo, un ensayo que se ha probado y usado ampliamente durante el desarrollo del ribointerruptor xpt-G17 en células de mamífero. La construcción SR-mut se usó como vector de control negativo que tiene los mismos elementos genéticos que la construcción xpt-G17 excepto que no hay secuencia de aptámero de guanina, por lo tanto no activa la expresión génica en respuesta al tratamiento con guanina. Estas dos construcciones se mezclaron entre sí para imitar una situación de biblioteca agrupada, aunque la biblioteca de ribointerruptores real es más compleja debido a la gran diversidad molecular generada por la aleatorización de nucleótidos. Las células transfectadas con 100% de ADN de construcción de xpt-G17 produjeron una tasa de inducción de 2000 de la actividad de luciferasa tras el tratamiento con guanina 500  $\mu$ M en comparación con las células no tratadas.  
 65

Cuando se diluyó el ADN de la construcción xpt-G17 con ADN de la construcción SR-mut, las células transfectadas con el ADN mezclado mostraron una tasa de inducción inferior de la actividad de luciferasa. Como se muestra en la Figura 3, la tasa de inducción disminuyó cuando la relación de construcción de xpt-G17 que responde a guanina a la construcción de SR-mut negativa que no responde disminuyó, pero todavía puede generar una tasa de inducción de 2,3 cuando hay 1 construcción positiva de 2000 moléculas, lo que indica la probabilidad de recuperar 1 ribointerruptor que responde al ligando de una mezcla de ribointerruptores que no responden al ligando.

Para ensayos distintos del descrito anteriormente, las sensibilidades del ensayo deben analizarse para proporcionar orientación para determinar el tamaño de las agrupaciones de sub-bibliotecas que se van a cribar.

Ejemplo 5

Construcción de una biblioteca de plásmidos de ribointerruptores basados en aptámeros agrupados y división de la biblioteca de ribointerruptores más grande en sub-bibliotecas cribables más pequeñas.

Procedimientos:

Construcción de biblioteca de plásmidos agrupados de ribointerruptores: Se amplificaron por PCR secuencias de aptámeros que contenían oligos Ultramer con bases aleatorizadas (véase el Ejemplo 2 para el diseño y composición de secuencias) usando el kit Platinum Pfx (Invitrogen) para generar fragmentos de ADN bicatenario, y el producto de PCR generado se analizó en gel de agarosa al 4%. El ADN con un tamaño de 153 pb se purificó en gel (Qiagen) y se digirió con enzima Bsal (NEB). El fragmento de ADN digerido con Bsal se ligó entonces al vector aceptor digerido con Bsal (mDHFR-Luci-Aceptor) como se describe en el Ejemplo 1 con una relación 1:5 de vector a insertar usando una ADN ligasa T4 (Roche). Las células competentes ElectroMAX DH5α-E se transformaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) con el producto de ligado y se sembraron en placas de agar. Las colonias bacterianas se agruparon y se recogieron, y se extrajo el ADN para obtener la biblioteca de plásmidos de ribointerruptores (P1).

Se usó un enfoque similar para generar una biblioteca de ribointerruptores plasmídicos más pequeña (P2) en la que las bases de nucleótidos en 5 posiciones en el aptámero se aleatorizaron generando un total de 1024 secuencias de aptámero diferentes (donde N indica una posición aleatorizada):

GACTTCGGTCTCATCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATGTA  
TANNNGCGTGGATATGGCACGCNNGTTTCTACCGGGCACCGTAAATGTCCGACT  
ACATTACGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGAAGAGACCAGACGG (SEQ ID NO:

10)

Transformación de DH5α químicamente competente: se usaron 227 pg de ADN plasmídico para transformar 50 µl de células competentes para obtener una relación 1:10 de ADN plasmídico y células bacterianas. Las células transformadas se sembraron en placas de agar después de ser incubadas a 37°C sin agitación durante 30 minutos, y las colonias se agruparon y se recogieron para la extracción de ADN usando un kit Miniprep de formato 96 (Qiagen) para obtener sub-bibliotecas de plásmidos agrupados de ribointerruptores.

Secuenciación de nueva generación (NGS): Se usó el ADN plasmídico de las sub-bibliotecas de ribointerruptores secundarias o terciarias como moldes, y se usaron los siguientes cebadores para generar amplicones por PCR que contienen las secuencias de aptámeros aleatorizadas: DHFR\_F: 5'-GACTTCGGTCTCATCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGTAATG-3' (SEQ ID NO: 11); IVS\_R: 5'-CCGTCTGGTCTTCACTGTTATTCTTTAGAATGGTGCG-3 (SEQ ID NO: 12). Los productos de PCR se sometieron a NGS usando la plataforma de extremos emparejados de Illumina MiSeq 2x150 pb para generar aproximadamente lecturas de 700K para cada muestra y análisis bioinformáticos posteriores para identificación de secuencia única y cálculo de abundancia relativa (Servicio proporcionado por Genewiz). Las secuencias que mostraron 12, o más de 12, lecturas de una ronda de secuenciación se consideran secuencias verdaderas.

Resultados

Para cribar aptámeros mediante un ensayo basado en células, se generó una biblioteca de plásmidos de ribointerruptores clonando la biblioteca de aptámeros en el vector mDHFR-Luci-Aceptor (Figura 5a). Las construcciones generadas contienen la misma configuración de elemento genético que en la construcción xpt-G17, siendo la única diferencia las secuencias de aptámero. Se empezó con una biblioteca de aptámeros generada como se describe en el Ejemplo 2, una biblioteca de aptámeros aleatorizada que comprende 10<sup>6</sup> secuencias únicas. Para asegurar una representación superior al 99,9% de la biblioteca de aptámeros inicial, se recogieron de las placas de agar un total de 7,5 x 10<sup>6</sup> colonias, que es 7,5 veces el número de secuencias

en la biblioteca de aptámeros. El ADN plasmídico extraído de las colonias recogidas forma la biblioteca de plásmidos (P1) que consiste en  $10^6$  ribointerruptores únicos.

5 Para dividir bibliotecas de plásmidos en sub-bibliotecas que sean lo suficientemente pequeñas para ser  
cribadas usando el ensayo basado en células desarrollado, se utilizó una estrategia, como se describe en la  
Figura 5b, que implica agrupar números más pequeños de colonias bacterianas transformadas y extraer el  
ADN para hacer sub-bibliotecas de plásmidos de ribointerruptores. Este procedimiento de dividir bibliotecas de  
plásmidos se puede realizar durante varias rondas para obtener el tamaño requerido de las sub-bibliotecas en  
10 las que se puede detectar un solo evento positivo (es decir, unión específica de aptámero/ligando que conduce  
a la expresión del gen indicador) basado en la sensibilidad del ensayo basado en células desarrollado para  
cribar la biblioteca, generando sub-bibliotecas primarias, secundarias o terciarias, respectivamente. El tamaño  
de las sub-bibliotecas se calculó como  $n$  (sub-biblioteca) =  $m$  (valor de representación) \*  $N$  (tamaño de  
biblioteca inicial)/ $d$  (valor de división). El "valor de división" representa el número total de sub-bibliotecas a  
15 obtener, y puede ser cualquier número que se desee. Aquí, se eligió 100 como valor de división para la facilidad  
de cálculo. Para la primera ronda de división, se recogieron  $6 \times 10^6$  colonias, que es 6 veces el número de  
ribointerruptores en la biblioteca de plásmidos inicial para obtener una representación mayor de 99% ( $10^6$ ).  
Para la segunda ronda de división, se eligió una representación de 1 de la sub-biblioteca primaria. Para la  
biblioteca de plásmidos con  $10^6$  ribointerruptores se construyó (P1), donde  $N=10^6$ ,  $m=6$ ,  $d=100$ , el tamaño de  
20 cada sub-biblioteca individual es  $n=6 \times 10^4$ . Se recogieron un total de  $6 \times 10^6$  colonias bacterianas en 100 tubos  
individuales y se extrajo el ADN de cada tubo individual para generar una sub-biblioteca primaria de plásmidos  
de ribointerruptores (P1S\_001 a P1S\_100). Usando la misma estrategia y comenzando con la sub-biblioteca  
P1S\_001, como un ejemplo, la sub-biblioteca primaria se dividió además en 100 sub-bibliotecas secundarias  
incluso más pequeñas denominadas P1S\_001\_001 a P1S\_001\_100. Por lo tanto, realizando dos rondas de  
25 división, se generaron sub-bibliotecas de plásmidos secundarios con 600 ribointerruptores en cada una. Las  
sub-bibliotecas de ribointerruptores pueden dividirse adicionalmente por la 3ª ronda de procedimientos de  
división para generar sub-bibliotecas de plásmidos terciarias.

30 Se usó el mismo enfoque para dividir la biblioteca de ribointerruptores de plásmidos P2 que contiene 1024  
secuencias de aptámeros únicas. Recogiendo 100 porciones de un total de 5000 colonias, se generaron 100  
sub-bibliotecas primarias P2S\_001 a P2S\_100, conteniendo cada sub-biblioteca aproximadamente 50  
ribointerruptores.

35 Para determinar la composición y la calidad de las bibliotecas de ribointerruptores generadas anteriormente,  
se realizó la secuenciación de nueva generación (NGS) en las sub-bibliotecas de plásmidos secundarias de  
ribointerruptores que supuestamente contienen 600 secuencias de ribointerruptores en cada sub-biblioteca. Se  
seleccionaron cuatro sub-bibliotecas secundarias al azar, donde dos de las sub-bibliotecas secundarias se  
generaron a partir de la sub-biblioteca primaria P1S\_003, y las otras dos sub-bibliotecas secundarias se  
generaron a partir de las sub-bibliotecas primarias P1S\_007 y P1S\_048, respectivamente. Como se muestra  
40 en la Figura 5c, cada una de las sub-bibliotecas secundarias contiene aproximadamente 500 o 600 secuencias  
únicas, consistente con el número de colonias que se recogieron para generar sub-bibliotecas secundarias. Un  
análisis adicional de los datos de NGS indica que entre las dos sub-bibliotecas secundarias (P1S\_003\_004 y  
P1S\_003\_041) que se generaron a partir de la misma sub-biblioteca primaria (P1S\_003), 39 secuencias están  
contenidas en ambas bibliotecas (Figura 5d). Cuando se comparan dos sub-bibliotecas secundarias,  
45 P1S\_003\_004 y P1S\_007\_021, que se derivaron de diferentes sub-bibliotecas primarias, P1S\_003 y P1S\_007,  
solo 3 secuencias son compartidas por ambas sub-bibliotecas (Figura 5e). Estos resultados indican que usando  
la estrategia descrita anteriormente, se generaron sub-bibliotecas de ribointerruptores plasmídicos con el  
número deseado de secuencias únicas que están listas para el cribado basado en células de mamífero.

#### 50 Ejemplo 6

Cribado basado en células de mamífero para nuevos aptámeros contra ligandos de elección.

55 Como se describe en el Ejemplo 5, se construyeron 100 sub-bibliotecas de plásmidos primarias (P1S\_001 a  
P1S\_100), que comprenden 60 k de ribointerruptores en cada agrupación, y se generaron 100 sub-bibliotecas  
de plásmidos secundarias (P1S\_001\_001 a P1S\_001\_100) que consisten en 600 ribointerruptores en cada  
una dividiendo adicionalmente la sub-biblioteca primaria P1S\_001 usando la misma estrategia. Las bibliotecas  
agrupadas se pueden disponer en formato de 96 pocillos para facilitar el cribado de alta productividad. Se  
realizó un cribado preliminar, usando el ensayo indicador de luciferasa como se describe en el Ejemplo 1, en  
60 las sub-bibliotecas primarias P1S\_001 a 006 así como las sub-bibliotecas de P1S\_001, contra guanina, que es  
contra la secuencia de aptámero inicial, como el ligando ensayado. El nivel basal de la actividad de luciferasa  
generado por construcciones de sub-bibliotecas primarias o sub-bibliotecas secundarias varió  
significativamente del de la construcción xpt-G17 (datos no mostrados), sugiriendo que los cambios en la  
secuencia de aptámero al aleatorizar bases en las posiciones seleccionadas tenían impacto en la  
65 inclusión/exclusión del exón que contiene codón de parada en diversa extensión, afectando por lo tanto a la  
expresión de luciferasa basal. Después del tratamiento con guanina, aunque las células transfectadas con la

sub-biblioteca primaria P1S\_005 de 60 k generaron una tasa de inducción de 1,8 de la actividad de luciferasa en comparación con las células no tratadas (Figura 6a), no se descubrió una tasa de inducción de más de 2 de la luciferasa cuando se usó guanina como ligando. Sin embargo, 7 de las 100 sub-bibliotecas secundarias produjeron una tasa de inducción de más de 2 de la actividad de luciferasa tras el tratamiento con guanina, generando la sub-biblioteca P1S\_001\_075 una tasa de inducción de 7,8 (Figura 6b). En el ensayo de sensibilidad descrito en el Ejemplo 4, se detectó una tasa de inducción de 6,3 cuando había 1 ribointerruptor xpt-G17 entre 500 moléculas que no responden al ligando. Basándose en este ensayo de sensibilidad, el resultado (tasa de 7,8) de esta selección preliminar de la sub-biblioteca P1S\_001\_075 sugiere que hay o bien 1 ribointerruptor de 600 que es funcionalmente equivalente a xpt-G17, o bien hay varios ribointerruptores más débiles de los cuales la suma de la actividad de luciferasa inducida es comparable a la de xpt-G17.

Para demostrar adicionalmente la aplicabilidad del cribado basado en células de mamífero de la presente invención para los ribointerruptores que contienen aptámeros funcionales y para descubrir nuevos aptámeros con actividad mejorada en respuesta a un ligando deseado, las sub-bibliotecas de la biblioteca P2 de ribointerruptores plasmídicos se cribaron en un formato de 96 pocillos con NAD<sup>+</sup>. Las bases de nucleótidos en las posiciones aleatorizadas en el aptámero de xpt-guanina se han ligado al ajuste de la actividad de ribointerruptor y a la denominada caja de ajuste (Stoddard, et al. *J Mol Biol.* 27 de mayo de 2013;425(10):1596-611). Por lo tanto, los cambios de nucleótidos en estas posiciones potencialmente generan secuencias que tienen actividad de ribointerruptor alterada en respuesta al tratamiento con ligando. Debido a la naturaleza de la guanina y su baja aplicabilidad *in vivo*, se eligió NAD<sup>+</sup> como ligando para potenciales nuevos aptámeros. Esta elección de ligando se basó en los resultados anteriores del cribado de la biblioteca de compuestos de Prestwick contra el ribointerruptor xpt-G17 parental, y el descubrimiento de que NAD<sup>+</sup> puede regular el ribointerruptor de guanina, generando una tasa de inducción de aproximadamente 40 a una concentración de 100 μM. En un intento de generar secuencias de aptámeros que tienen actividad de ribointerruptor mejorada contra NAD<sup>+</sup>, los autores de la invención generaron y seleccionaron las sub-bibliotecas de P2 (que tienen cambios de nucleótidos en las 5 posiciones mencionadas anteriormente en el aptámero) usando luciferasa como gen indicador. Como se muestra en la Figura 6c, múltiples sub-bibliotecas, aproximadamente 50 ribointerruptores en cada una, produjeron una tasa de inducción de más de 10 de la expresión de luciferasa en respuesta al tratamiento de NAD<sup>+</sup> 100 μM, generando una de las sub-bibliotecas, P2S\_002, una tasa de inducción de 37, mientras que una sola construcción de ribointerruptor xpt-G17 mostró una tasa de inducción de 32 en respuesta al tratamiento de NAD<sup>+</sup> a la misma concentración.

Estos resultados de cribado indican que entre los aproximadamente 50 ribointerruptores en las sub-bibliotecas que produjeron una tasa de inducción de más de 10 de la expresión de luciferasa, hay ribointerruptores que pueden producir una tasa de inducción mínima de 10, suponiendo que todos los ribointerruptores en la biblioteca responden al tratamiento de NAD<sup>+</sup>. En la sub-biblioteca P2S\_002 que produjo una tasa de inducción de 37, que es mayor que la tasa de inducción generada por G17, hay al menos 1 ribointerruptor que funciona mucho mejor que G17. Para ensayar adicionalmente esto, se cribaron 96 construcciones individuales derivadas de la sub-biblioteca P2S\_002. Como se muestra en la Figura 6d, aunque múltiples construcciones perdieron o produjeron menos inducción que G17, un número de construcciones individuales produjeron mayor tasa de inducción que la construcción G17, lo que indica que los cambios de nucleótidos en la caja de ajuste afectan notablemente a la actividad de ribointerruptor en respuesta al tratamiento con ligando en células. Usando este enfoque, se identificaron un número de diferentes secuencias de caja de ajuste (como se muestra en la Tabla 2), con las que los ribointerruptores produjeron una mayor tasa de inducción de luciferasa que la construcción G17 tras el tratamiento con NAD<sup>+</sup>, produciendo múltiples secuencias de aptámeros una tasa de inducción de más de 100.

Tabla 2. Ribointerruptores con expresión de gen indicador mejorada en células de mamífero en respuesta al ligando, NAD<sup>+</sup>. Las secuencias de la caja de ajuste están subrayadas.

SEQ ID NO:	Construcción	Secuencia
13	G17	ATAATCGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
14	n.º 02	ATAACCGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
15	n.º 16	ATAGCCGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
16	n.º 17	ATAAGGGCGTGGATATGGCACGCTCGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
17	n.º 21	ATAAATGCGTGGATATGGCACGCATGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT

SEQ ID NO:	Construcción	Secuencia
18	n.º 26	ATAAGCGCGTGGATATGGCACGCGCGTTTCTACCGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
19	n.º 29	ATAGTGGCGTGGATATGGCACGCCAGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
20	n.º 31	ATAAAGCGCGTGGATATGGCACGCCCGTTTCTACCGGGCAC CGTAAATGTCCGACT
21	n.º 33	ATAGTTGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
22	n.º 36	ATAGCGGCGTGGATATGGCACGCTGGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
23	n.º 41	ATAATGGCGTGGATATGGCACGCTAGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
24	n.º 46	ATAATTGCGTGGATATGGCACGCAAGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
25	n.º 54	ATAATTGCGTGGATATGGCACGCGAGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
26	n.º 61	ATAATCGCGTGGATATGGCACGCGAGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT
27	n.º 69	ATAACTGCGTGGATATGGCACGCGGGTTTCTACCGGGCACC GTAAATGTCCGACT

Una de las nuevas construcciones, n.º 46, se ensayó adicionalmente. Como se muestra en la Figura 6e y la Figura 6f, la nueva construcción n.º 46 respondió al tratamiento con NAD<sup>+</sup> de una manera dependiente de la dosis y mostró una mejora superior en el nivel de expresión del gen indicador inducida así como en la tasa de inducción cuando se compara con la construcción G17. Las nuevas construcciones también tienen una regulación génica mejorada en respuesta al tratamiento con guanina (datos no mostrados).

Por lo tanto, la presente invención proporciona un enfoque donde una biblioteca de ribointerruptores relativamente grande se puede dividir en una sub-biblioteca de ribointerruptores más pequeña que se puede cribar por medio de un ensayo basado en células de mamífero. Además, a partir de la biblioteca de ribointerruptores, se descubrieron nuevas secuencias que tienen actividades de ribointerruptores mejoradas en células de mamífero.

#### Referencias:

- Mandal, Maumita, Benjamin Boese, Jeffrey E. Barrick, Wade C. Winkler y Ronald R. Breaker. "Riboswitches Control Fundamental Biochemical Pathways in *Bacillus Subtilis* and Other Bacteria." *Cell* 113, n.º 5 (30 de mayo de 2003): 577-86.
- Mandal, Maumita y Ronald R. Breaker. "Adenine Riboswitches and Gene Activation by Disruption of a Transcription Terminator." *Nature Structural & Molecular Biology* 11, n.º 1 (Enero de 2004): 29-35. doi:10.1038/nsmb710.
- Mulhbachter, Jerome y Daniel A. Lafontaine. "Ligand Recognition Determinants of Guanine Riboswitches." *Nucleic Acids Research* 35, n.º 16 (2007): 5568-80. doi:10.1093/nar/gkm572.
- Serganov, Alexander, Yu-Ren Yuan, Olga Pikovskaya, Anna Polonskaia, Lucy Malinina, Anh Tuan Phan, Claudia Hobartner, Ronald Micura, Ronald R. Breaker y Dinshaw J. Patel. "Structural Basis for Discriminative Regulation of Gene Expression by Adenine- and Guanine-Sensing mRNAs." *Chemistry & Biology* 11, n.º 12 (Diciembre de 2004): 1729-41. doi:10.1016/j.chembiol.2004.11.018.
- Edwards, Andrea L. y Robert T. Batey. "A Structural Basis for the Recognition of 2'-deoxyguanosine by the Purine Riboswitch." *Journal of Molecular Biology* 385, n.º 3 (23 de enero de 2009): 938-48. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.074.
- Batey, Robert T., Sunny D. Gilbert y Rebecca K. Montange. "Structure of a Natural Guanine-Responsive Riboswitch Complexed with the Metabolite Hypoxanthine." *Nature* 432, n.º 7015 (18 de noviembre de 2004): 411-15. doi:10.1038/nature03037.
- Serganov, Alexander, Yu-Ren Yuan, Olga Pikovskaya, Anna Polonskaia, Lucy Malinina, Anh Tuan Phan, Claudia Hobartner, Ronald Micura, Ronald R. Breaker y Dinshaw J. Patel. "Structural Basis for Discriminative



- Regulation of Gene Expression by Adenine- and Guanine-Sensing mRNAs." *Chemistry & Biology* 11, n.º 12 (Diciembre de 2004): 1729-41. doi:10.1016/j.chembiol.2004.11.018.
8. Ellington, A. D. y J. W. Szostak. "In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands." *Nature* 5 346, n.º 6287 (30 de agosto de 1990): 818-22. doi:10.1038/346818a0.
9. Tuerk, C. y L. Gold. "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase." *Science* (New York, N.Y.) 249, n.º 4968 (3 de agosto de 1990): 505-10.
- 10 10. Ozer, Abdullah, John M. Pagano y John T. Lis. "New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization." *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 3 (2014): e183. doi:10.1038/mtna.2014.34.
- 15 11. Keschull, Justus M. y Anthony M. Zador. "Sources of PCR-Induced Distortions in High-Throughput Sequencing Data Sets." *Nucleic Acids Research* 43, n.º 21 (2 de diciembre de 2015): e143. doi:10.1093/nar/gkv717.

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar un aptámero que se une a un ligando en células eucariotas que comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una biblioteca de aptámeros,
- (b) introducir los miembros de la biblioteca de aptámeros en un casete de polinucleótido para la expresión mediada por ligando de un gen indicador para crear una biblioteca de ribointerruptores,
- 10 (c) introducir la biblioteca de ribointerruptores en células eucariotas, y
- (d) poner en contacto las células eucariotas con un ligando, y
- 15 (e) medir la expresión del gen indicador,
- en donde el casete de polinucleótido comprende un exón empalmado de forma alternativa, flanqueado por un intrón 5' y un intrón 3', y un ribointerruptor que comprende (i) una región efectora que comprende un tallo que incluye la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3' y una secuencia complementaria de la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3', y (ii) un aptámero colocado entre la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3' y la secuencia complementaria, en donde el exón empalmado de forma alternativa comprende un codón de parada que está en el marco con el gen indicador cuando el exón empalmado de forma alternativa está empalmado en el ARNm del gen indicador.
- 20
2. El método de la reivindicación 1, en donde la biblioteca de aptámeros se divide en una biblioteca de aptámeros más pequeña antes de introducir en los casetes de polinucleótidos, que comprende las etapas:
- (a) proporcionar una biblioteca de aptámeros aleatorizados en donde los aptámeros de la biblioteca comprenden múltiples regiones constantes 5' y 3' y uno o más nucleótidos aleatorizados,
- 30 (b) realizar una PCR de dos ciclos utilizando la biblioteca de aptámeros aleatorizados como molde y un primer cebador y segundo cebador que son complementarios de las regiones constantes 5' y 3',
- (c) aislar los productos de la PCR de dos ciclos, y
- 35 (d) amplificar por PCR un subconjunto de los productos aislados de la PCR de dos ciclos usando cebadores complementarios de un subconjunto de las regiones constantes 5' y 3' únicas.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la biblioteca de ribointerruptores se divide en una o más sub-bibliotecas de ribointerruptores antes de introducirlas en las células eucariotas, opcionalmente, en donde la biblioteca de ribointerruptores se subdivide en sub-bibliotecas, que comprende las etapas de:
- 40 (a) introducir la biblioteca de ribointerruptores en bacterias;
- 45 (b) recoger clones bacterianos y extraer el ADN plasmídico para obtener sub-bibliotecas de plásmidos de ribointerruptores para generar una o más sub-bibliotecas primarias;
- (c) opcionalmente, generar sub-bibliotecas secundarias de ribointerruptores a partir de una sub-biblioteca primaria de plásmidos de ribointerruptores introduciendo una sub-biblioteca primaria en bacterias, recogiendo clones bacterianos y aislando el ADN plasmídico.
- 50
4. Un método para seleccionar un ligando que se une a un aptámero en una célula eucariota que comprende las etapas de:
- 55 (a) proporcionar una biblioteca de ligandos,
- (b) proporcionar un casete de polinucleótido para la expresión mediada por ligando de un gen indicador,
- (c) introducir el casete de polinucleótido en la célula eucariota,
- 60 (d) poner en contacto grupos individuales de la célula eucariota con miembros de la biblioteca de ligandos, y
- (e) medir la expresión del gen indicador,
- 65 en donde el casete de polinucleótido comprende un exón empalmado de forma alternativa, flanqueado por un

- intrón 5' y un intrón 3', y un ribointerruptor que comprende (i) una región efectora que comprende un tallo que incluye la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3' y una secuencia complementaria de la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3', y (ii) un aptámero colocado entre la secuencia del sitio de empalme 5' del intrón 3' y la secuencia complementaria, en donde el exón empalmado de forma alternativa comprende un
- 5 codón de parada que está en el marco con el gen indicador cuando el exón empalmado de forma alternativa está empalmado en el ARNm del gen indicador.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde el ligando es
- 10 (a) una molécula pequeña; o
- (b) una molécula producida por la célula eucariota seleccionada del grupo que consiste en un metabolito, ácido nucleico, vitamina, cofactor, lípido, monosacárido y segundo mensajero.
- 15 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta y una célula de levadura.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde el gen indicador se selecciona del
- 20 grupo que consiste en
- (a) una proteína fluorescente, luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa y peroxidasa de rábano picante; o
- (b) una citocina, una molécula de señalización, una hormona del crecimiento, un anticuerpo, un ARN regulador, una proteína terapéutica o un péptido.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde los intrones 5' y 3' son
- (a) derivados del intrón 2 del gen de  $\beta$ -globina humana;
- 30 (b) cada uno independientemente de 50 a 300 nucleótidos de longitud; o
- (c) cada uno independientemente de 125 a 240 nucleótidos de longitud.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde el tallo de la región efectora tiene
- (a) de 7 a 20 pares de bases de longitud; o
- (b) de 8 a 11 pares de bases de longitud.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en donde el exón empalmado de forma alternativa
- (a) deriva del grupo que consiste en el exón 2 del gen de la dihidrofolato reductasa humana (DHFR), el exón 5 del tumor de Wilms 1 humano mutante, exón 16 de la proteína quinasa II delta dependiente de calcio/calmodulina de ratón y el exón 6 de SIRT1;
- 45 (b) es un exón 2 modificado de la DHFR humana;
- 50 (c) no deriva de un exón de origen natural; o
- (d) comprende uno o más del grupo que consiste en un potenciador de empalme de exón alterado, un silenciador de empalme de exón alterado, un potenciador de empalme de exón añadido, y un silenciador de empalme de exón añadido.
- 55 11. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 3, en donde la biblioteca de aptámeros comprende aptámeros que tienen uno o más nucleótidos aleatorizados.
12. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el primer o segundo cebador en la PCR de
- 60 dos ciclos comprende un marcador seleccionado del grupo que consiste en biotina, digoxigenina (DIG), bromodesoxiuridina (BrdU), fluoróforo y un grupo químico utilizado en la química click.

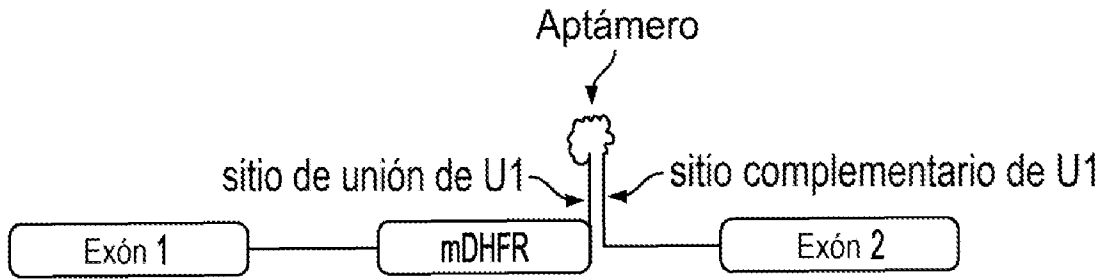


FIG. 1a

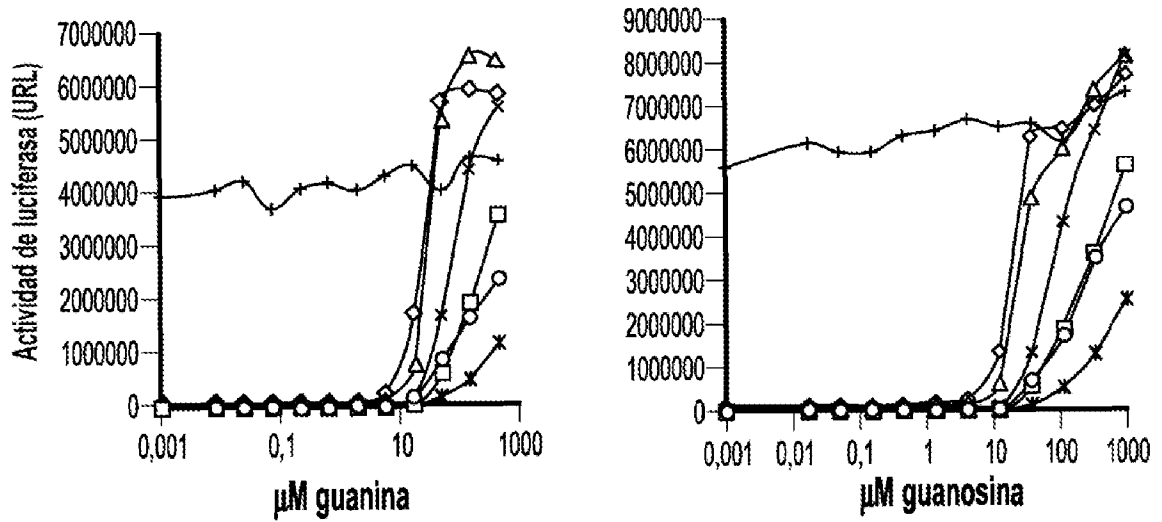
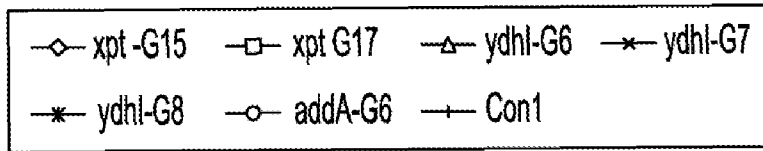


FIG. 1b

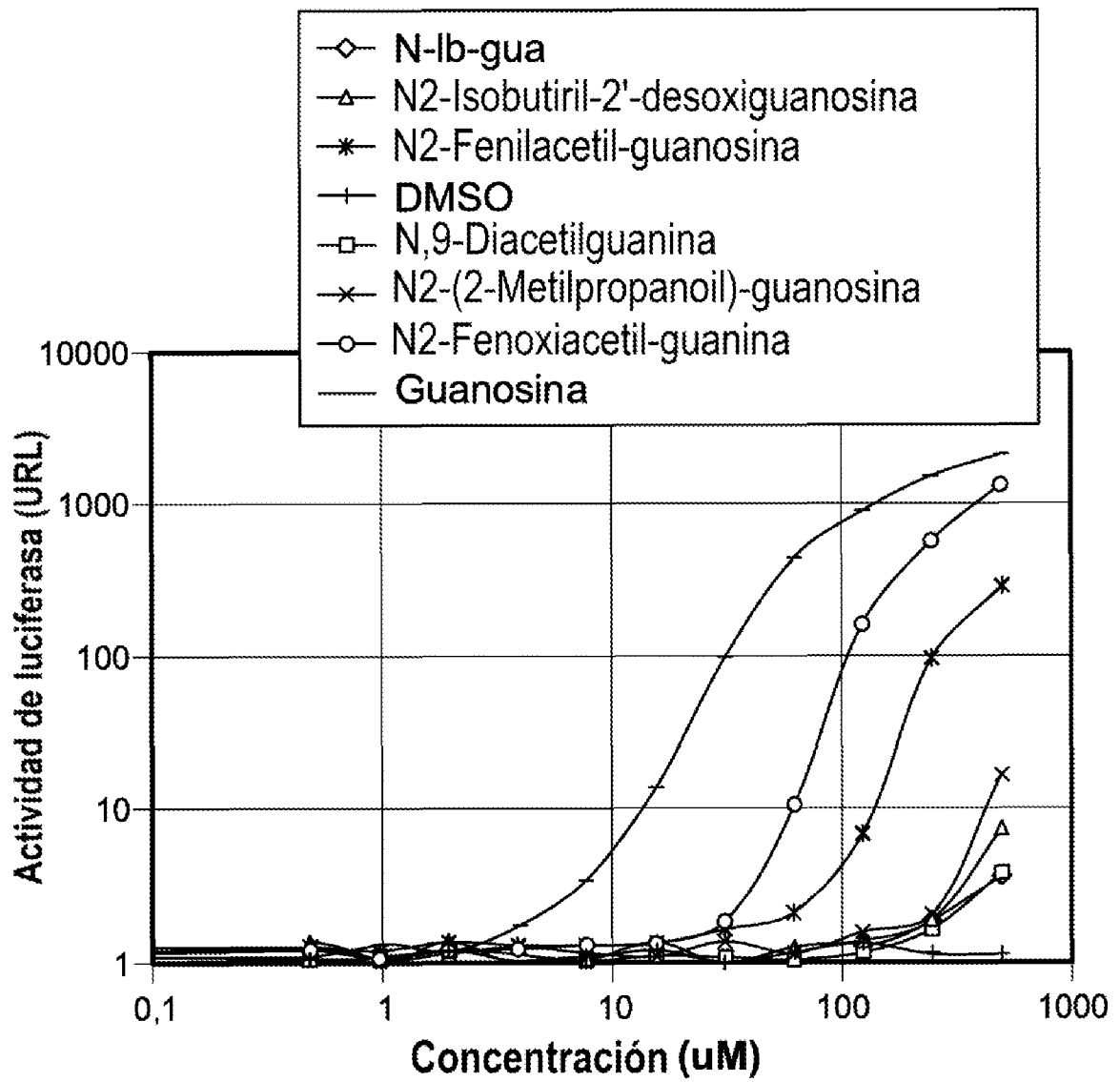


FIG. 1c

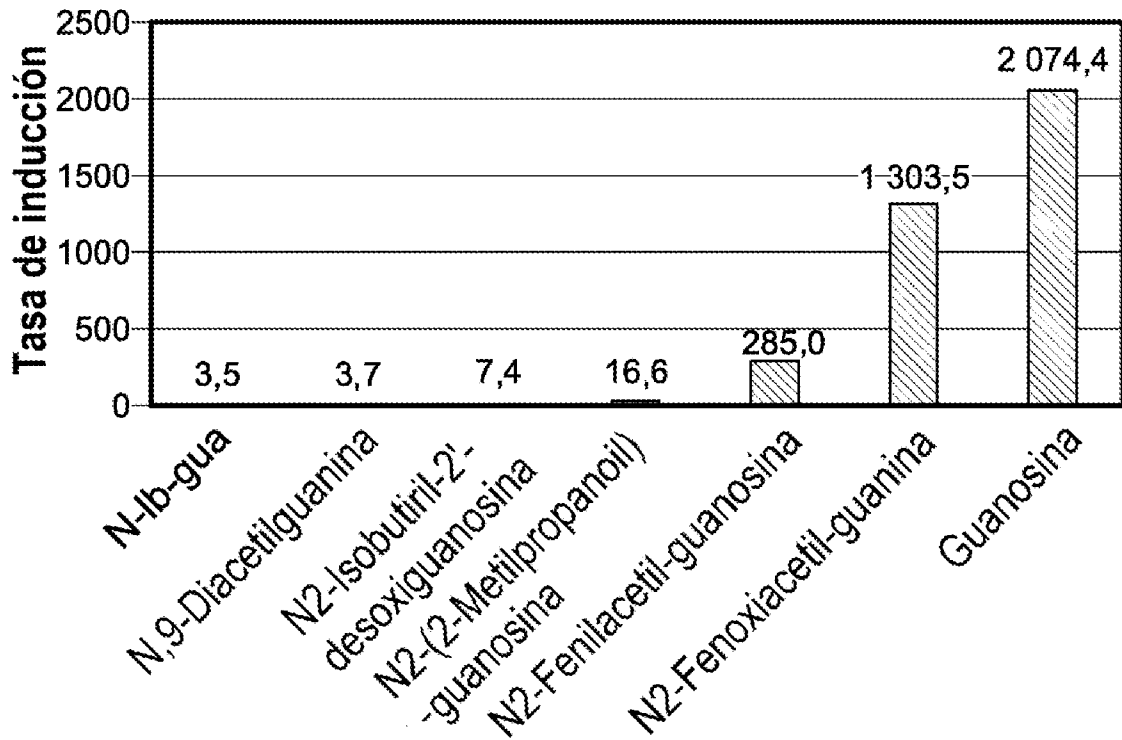


FIG. 1d

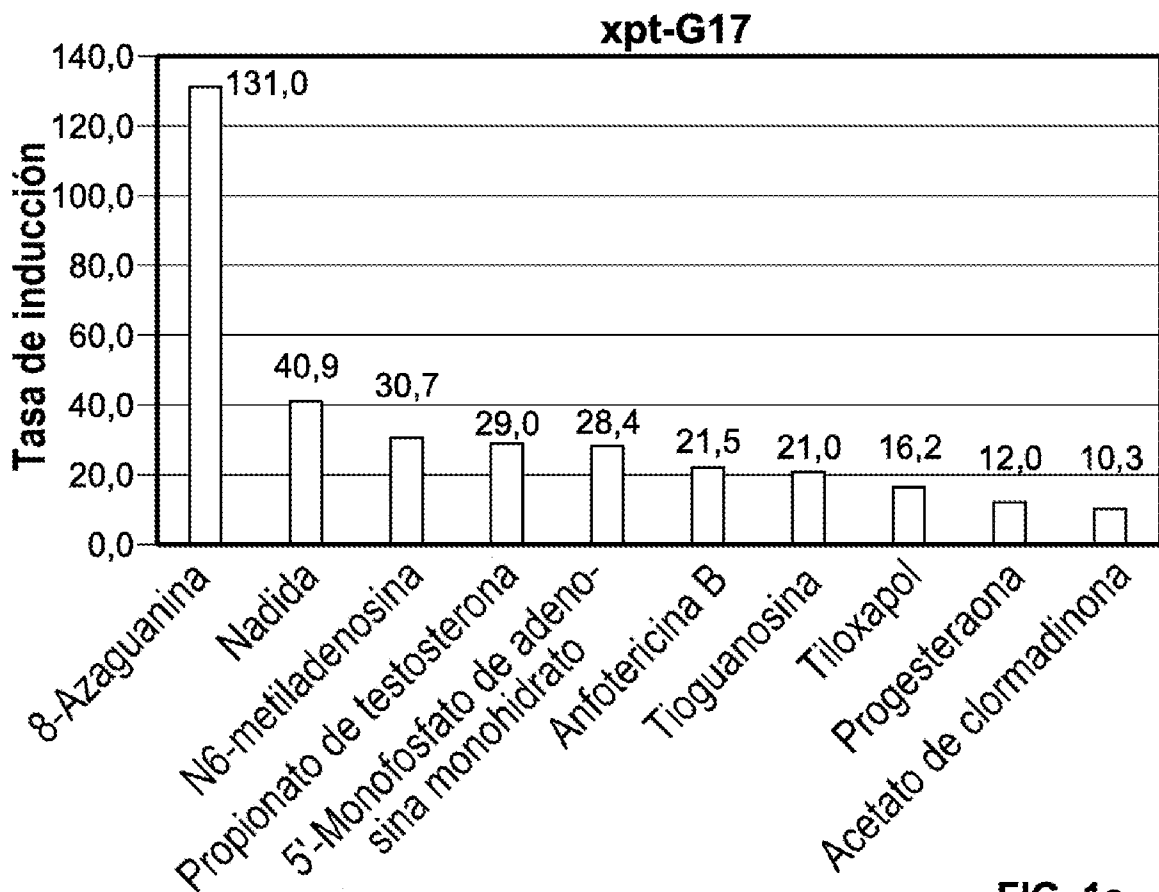
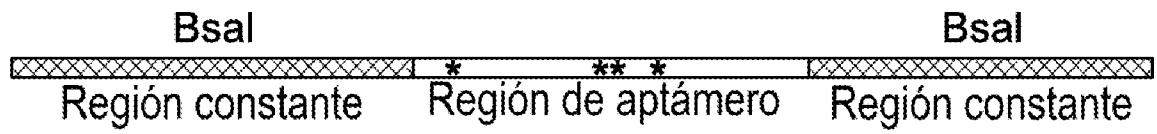


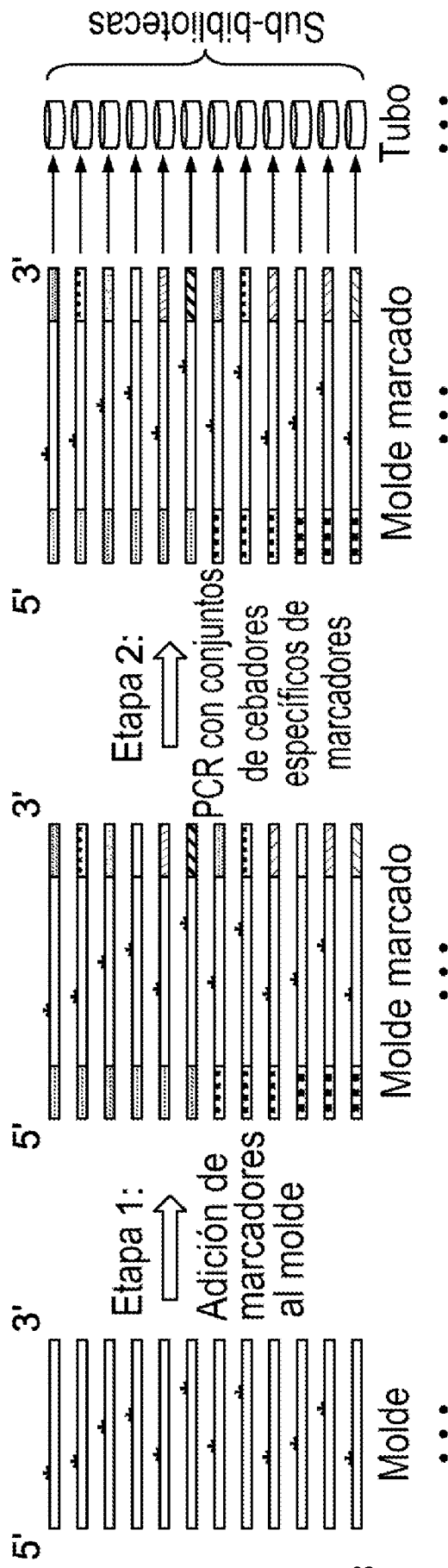
FIG. 1e



\* Indica región aleatorizada

Molde para generar secuencia de aptámero aleatorizada

**FIG. 2**



\* Indica región aleatorizada

Estrategia de división de biblioteca de aptámeros aleatorizados por secuenciación marcado y amplificación por PCR

**FIG. 3a**



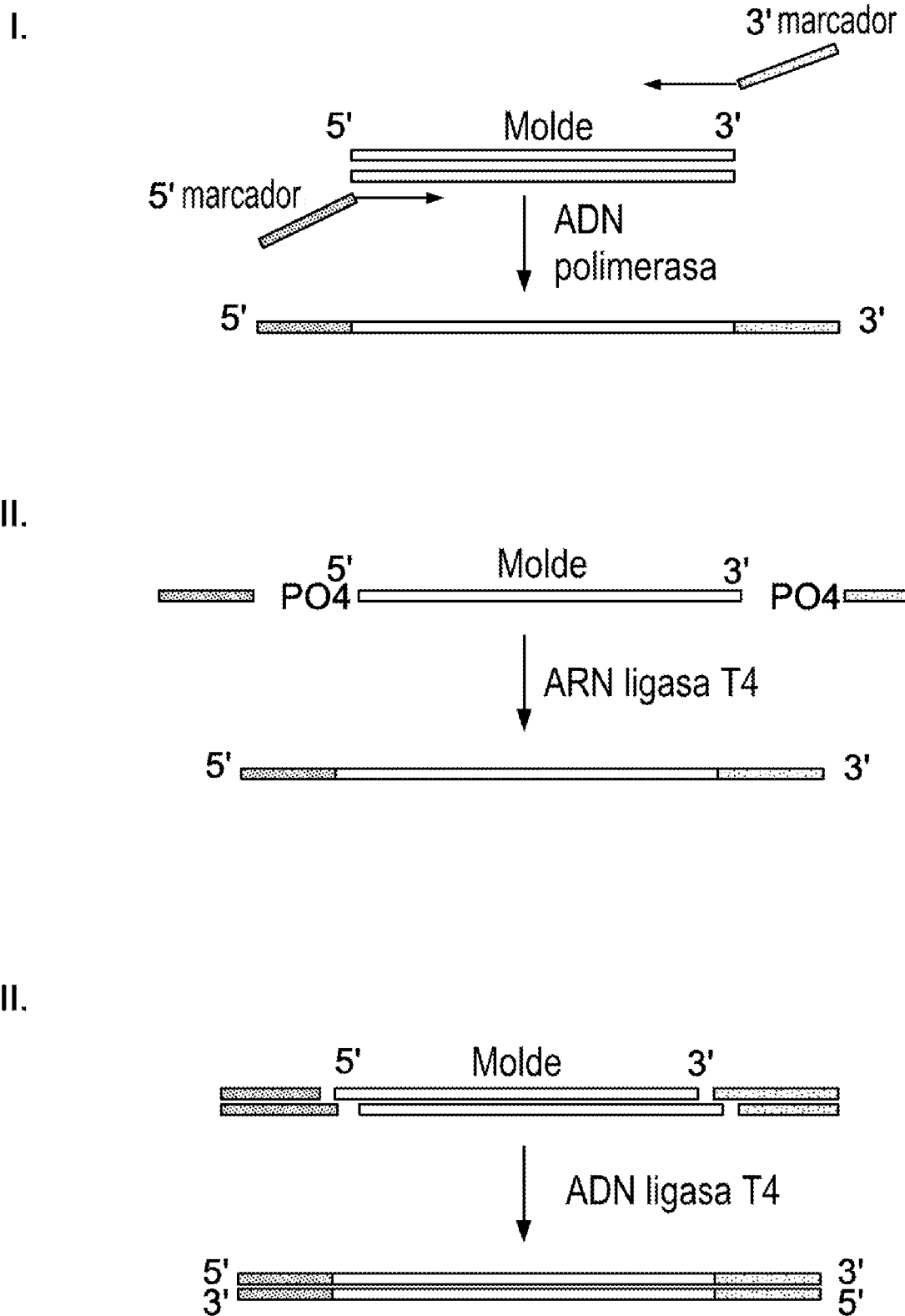
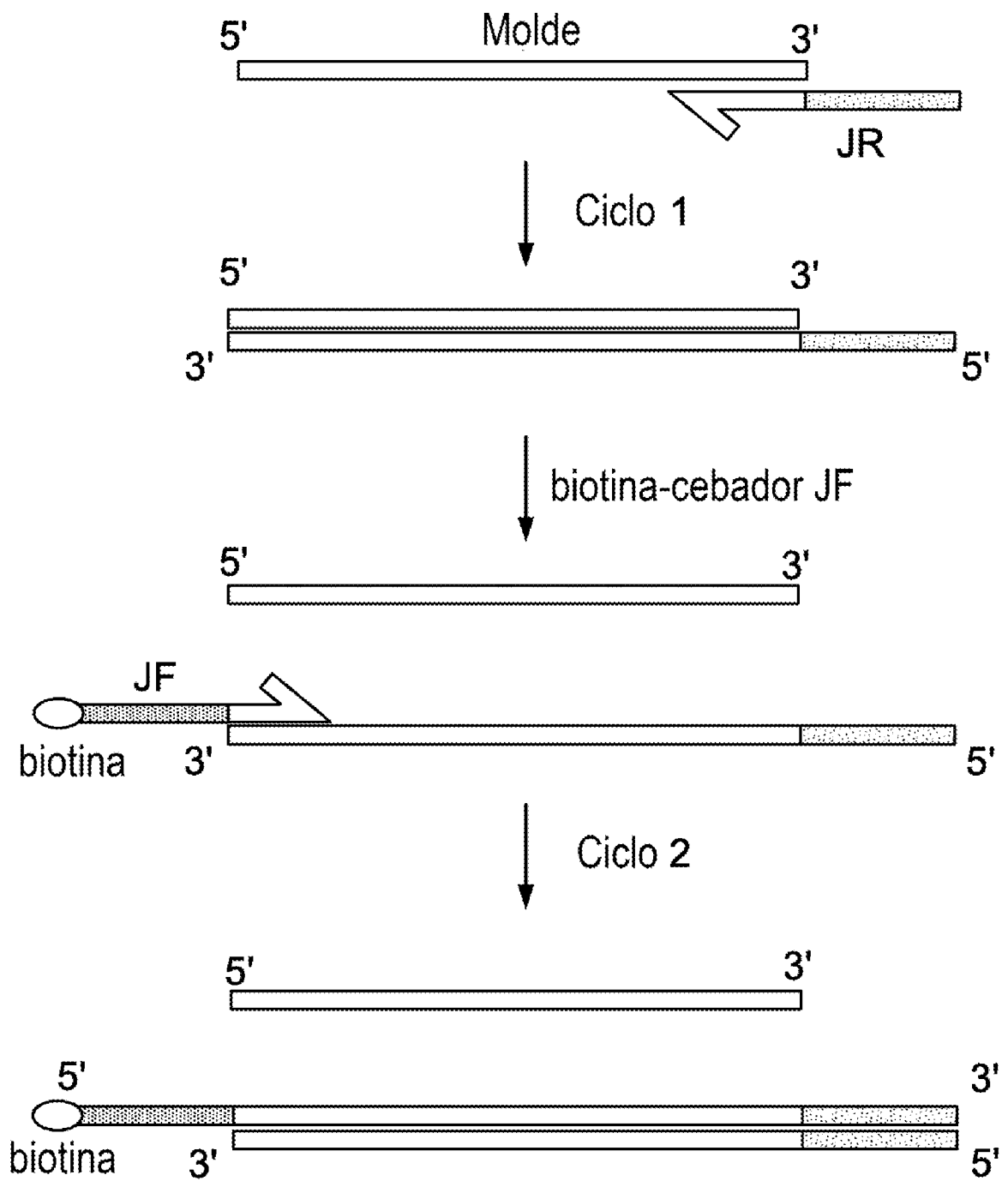
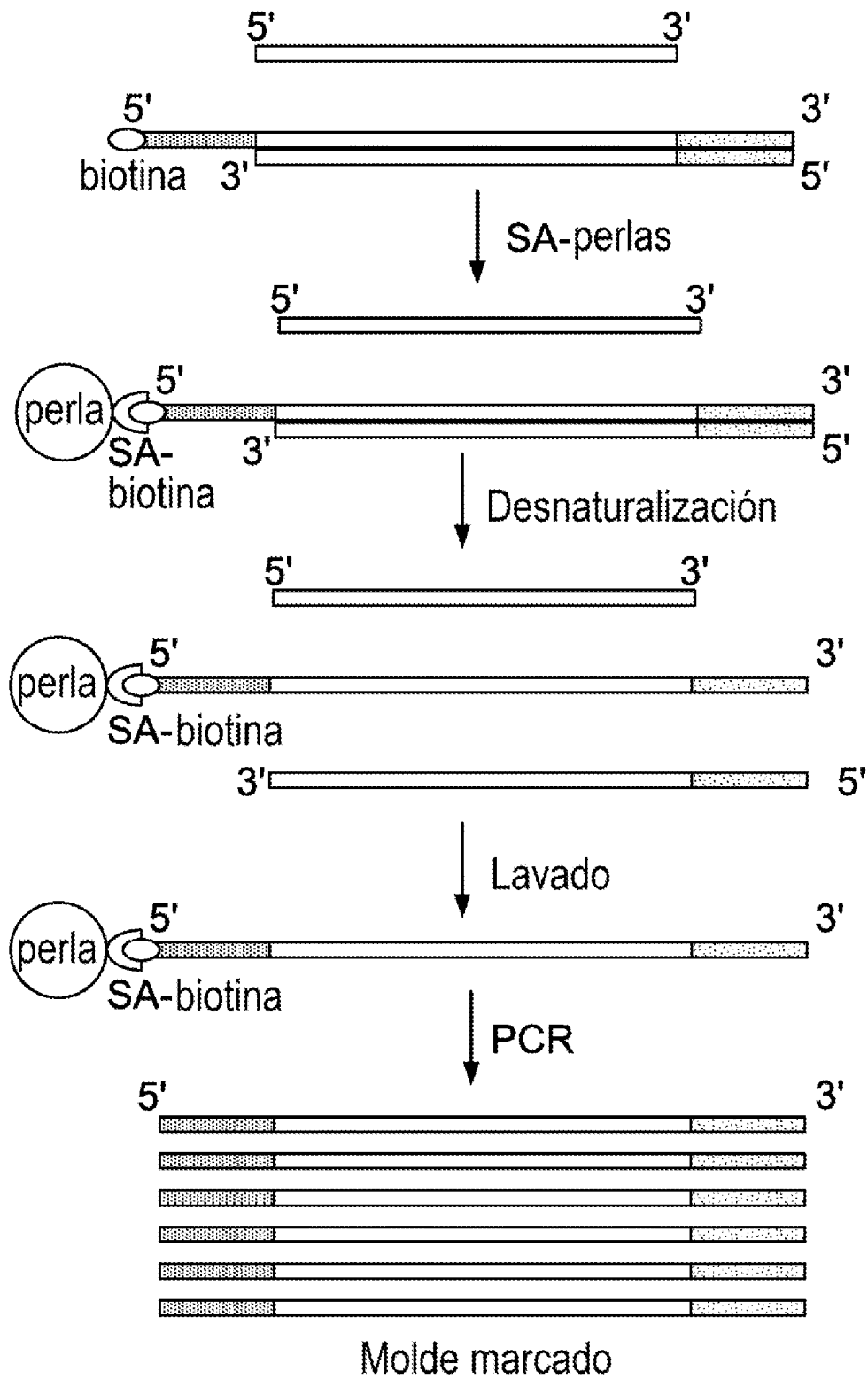


FIG. 3b



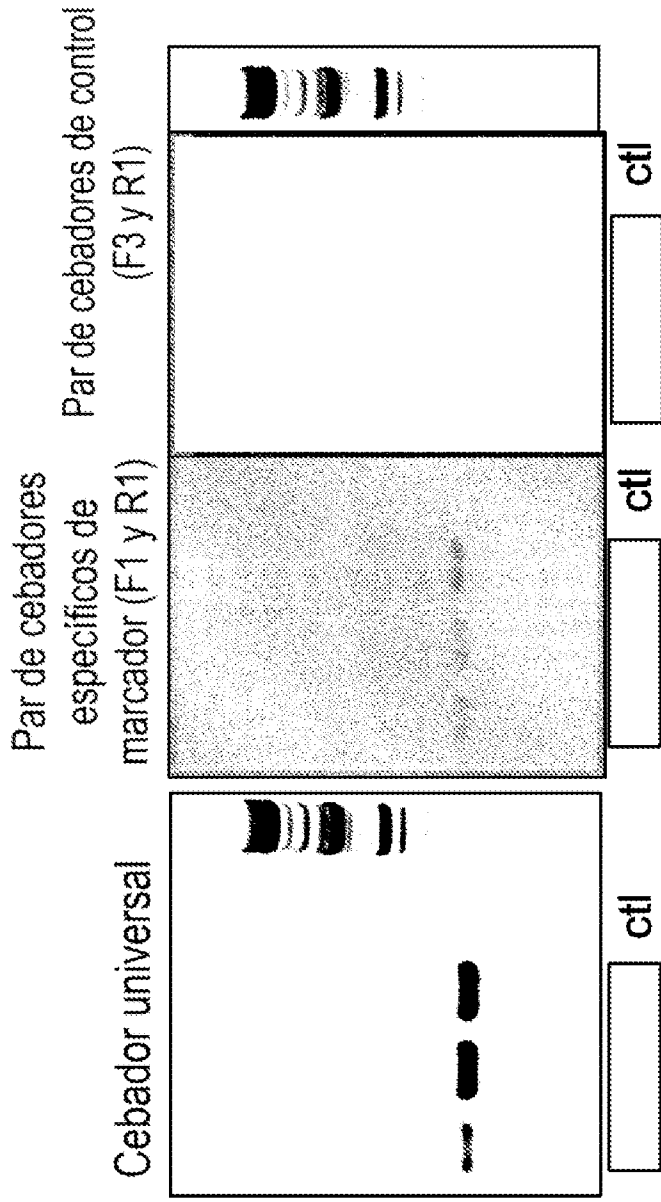
PCR de dos ciclos para añadir marcadores de secuencia

**FIG. 3c**



Generación de biblioteca de aptámeros marcados

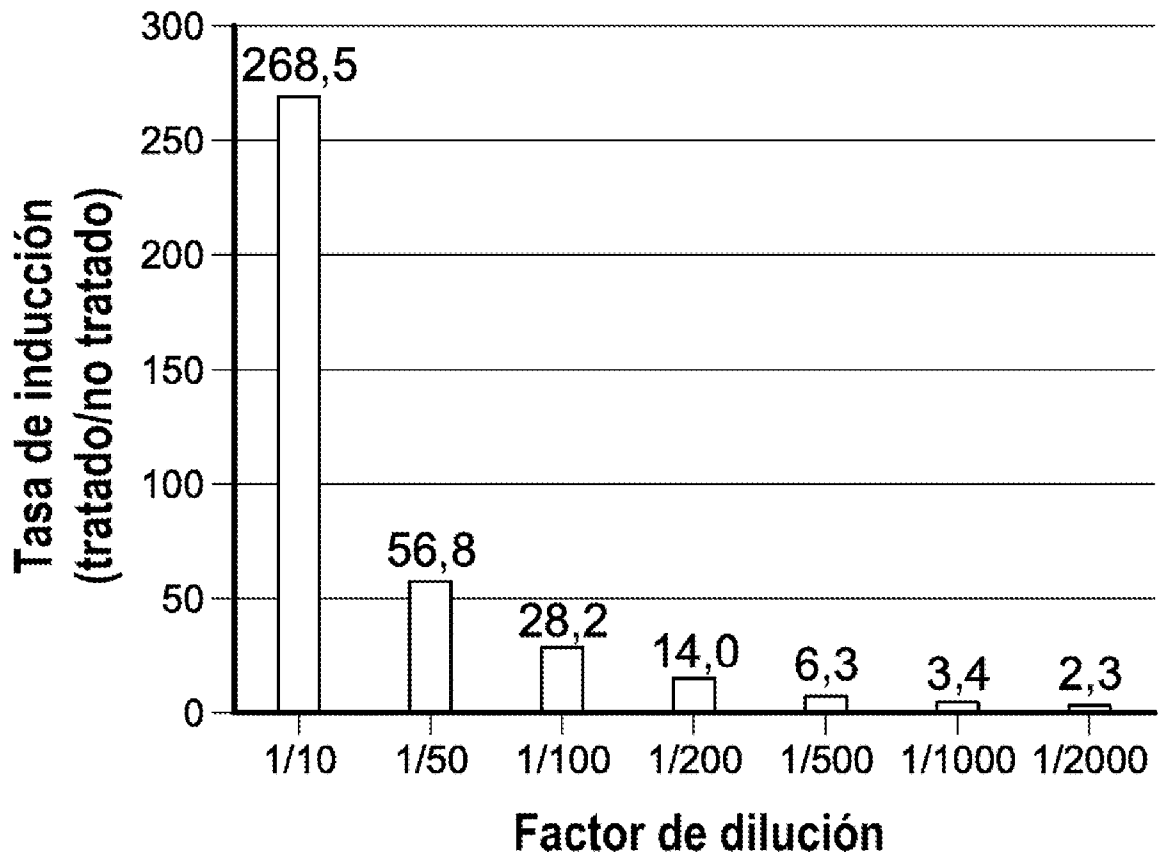
**FIG. 3d**



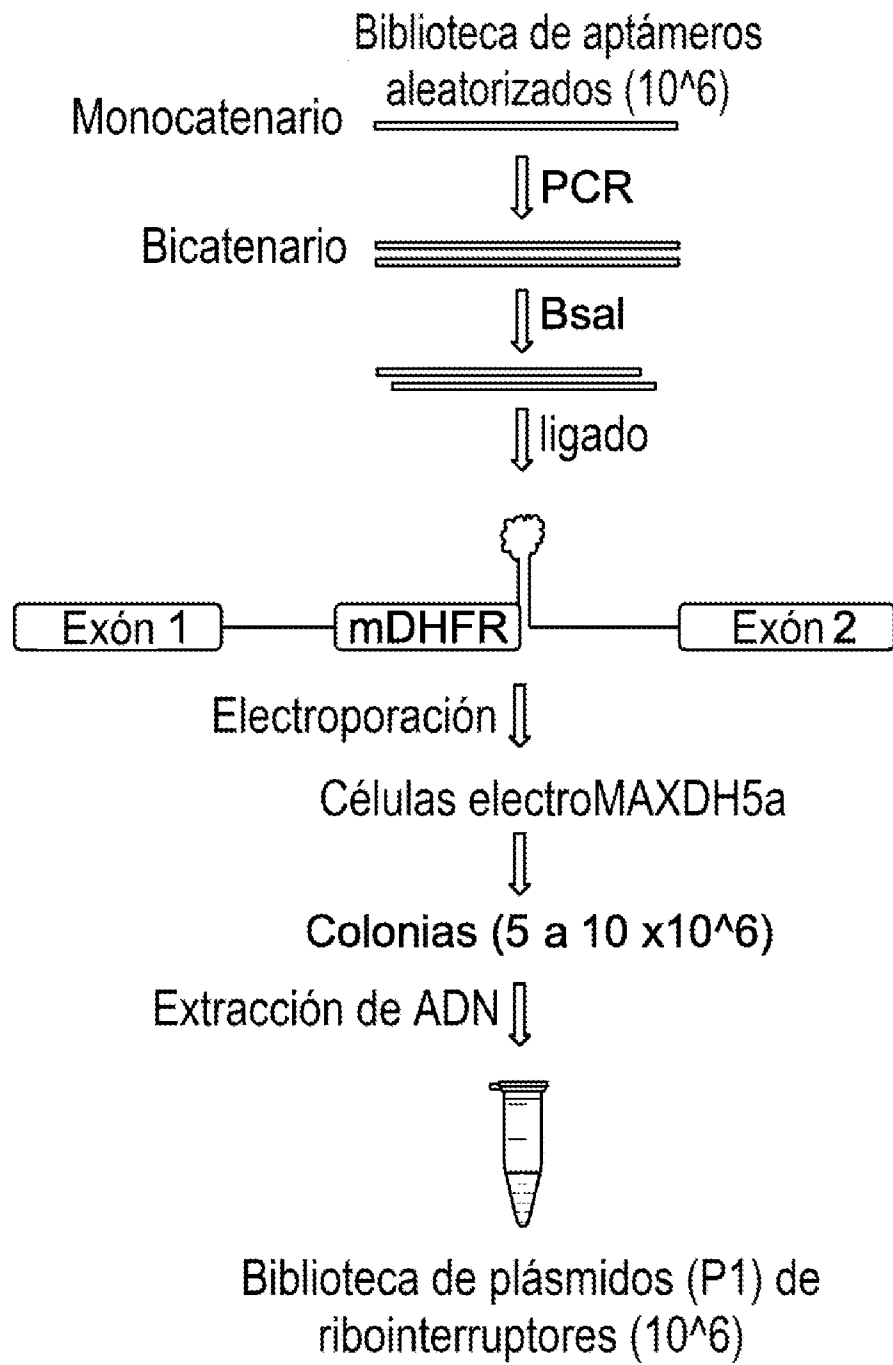
Cantidad de molde    Cantidad de molde    Cantidad de molde

Cantidades de molde de izquierda a derecha son: 1 copia, 2,3 copias y 4,6 copias.

**FIG. 3e**



**FIG. 4**



**FIG. 5a**

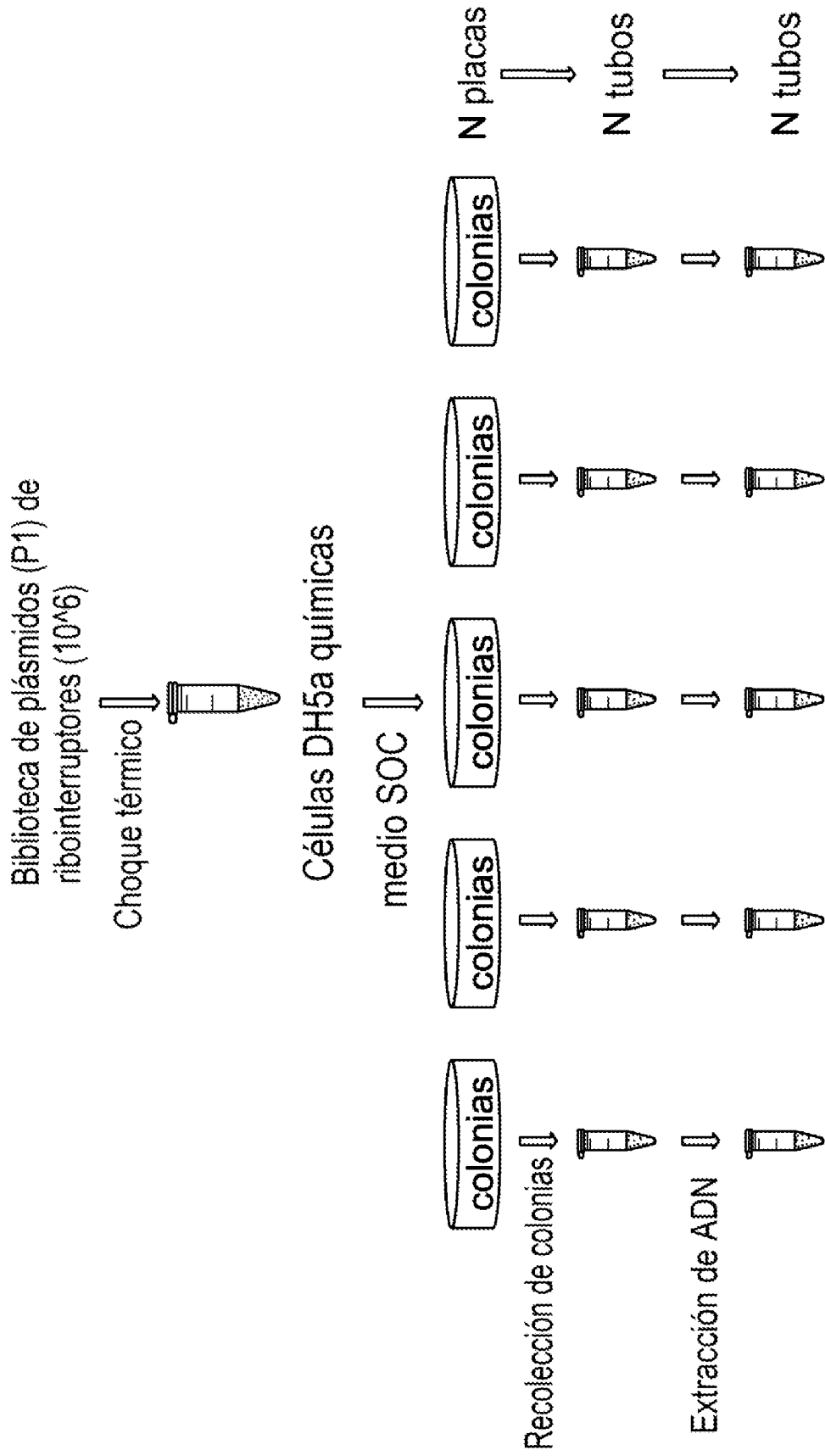


FIG. 5b

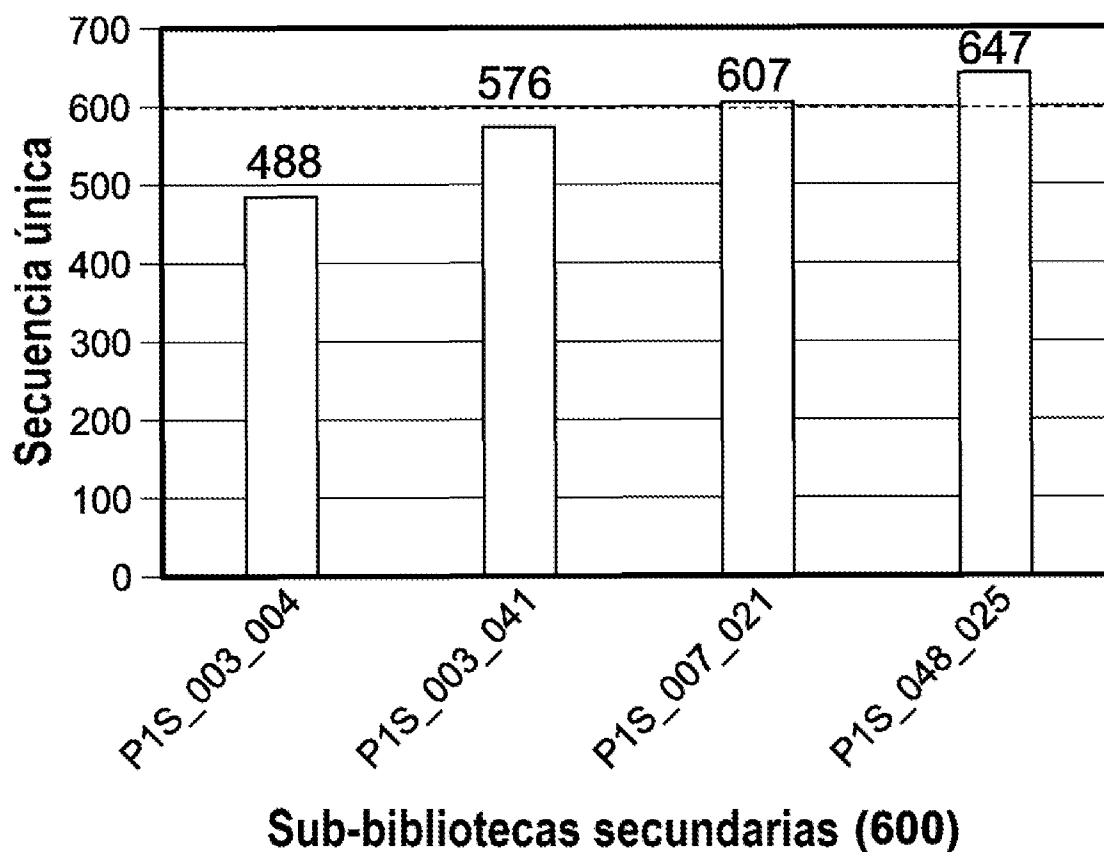
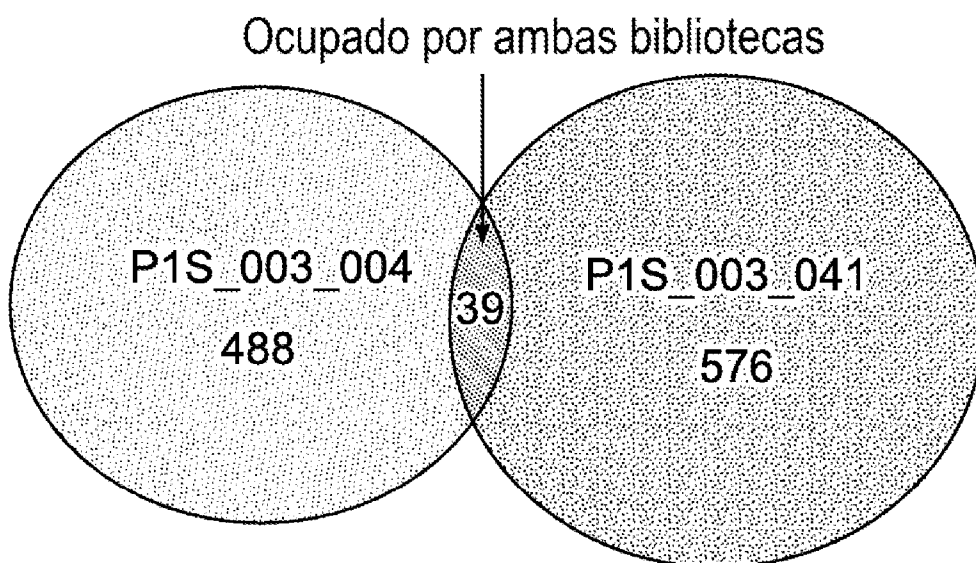
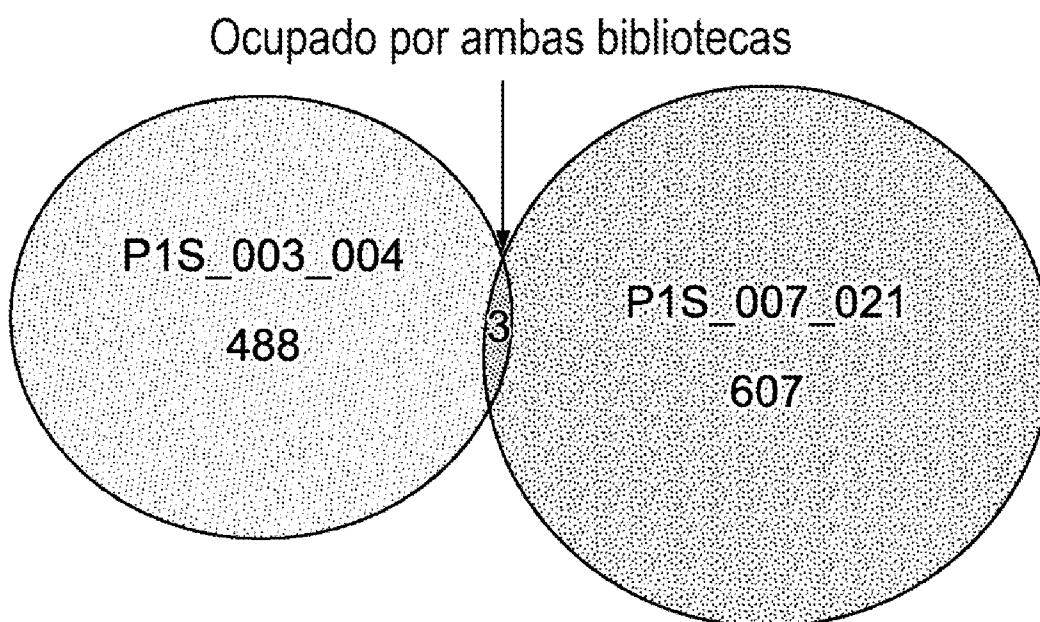


FIG. 5c





**FIG. 5d**



**FIG. 5e**

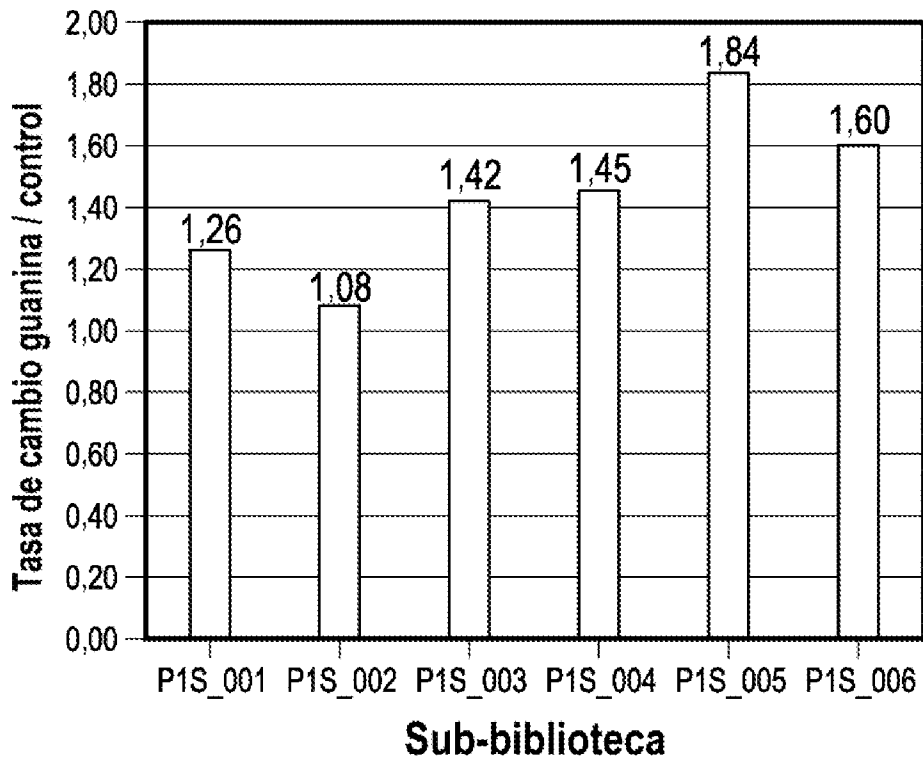


FIG. 6a

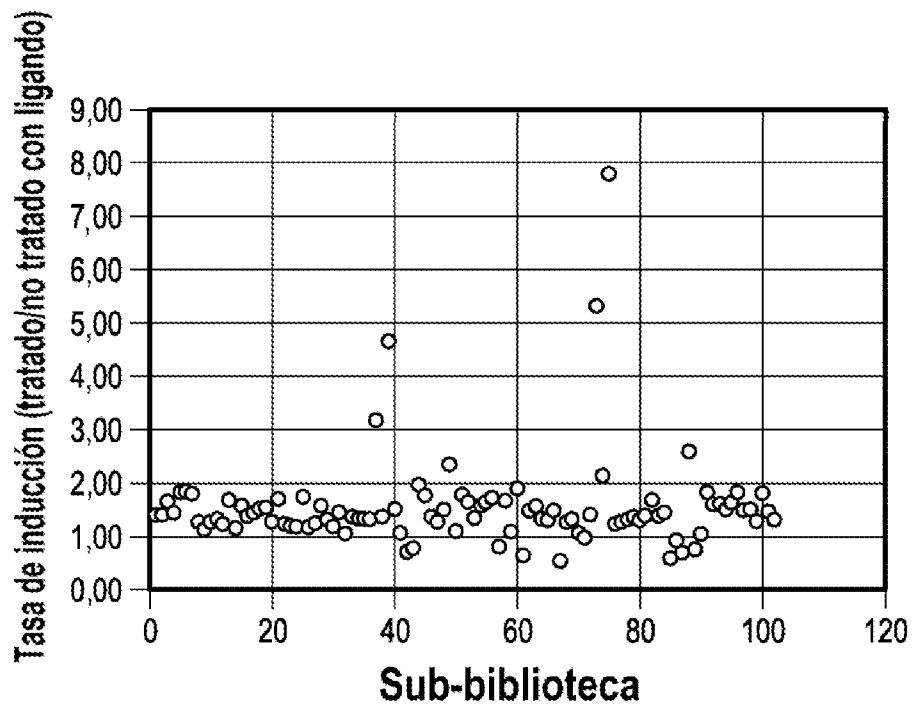
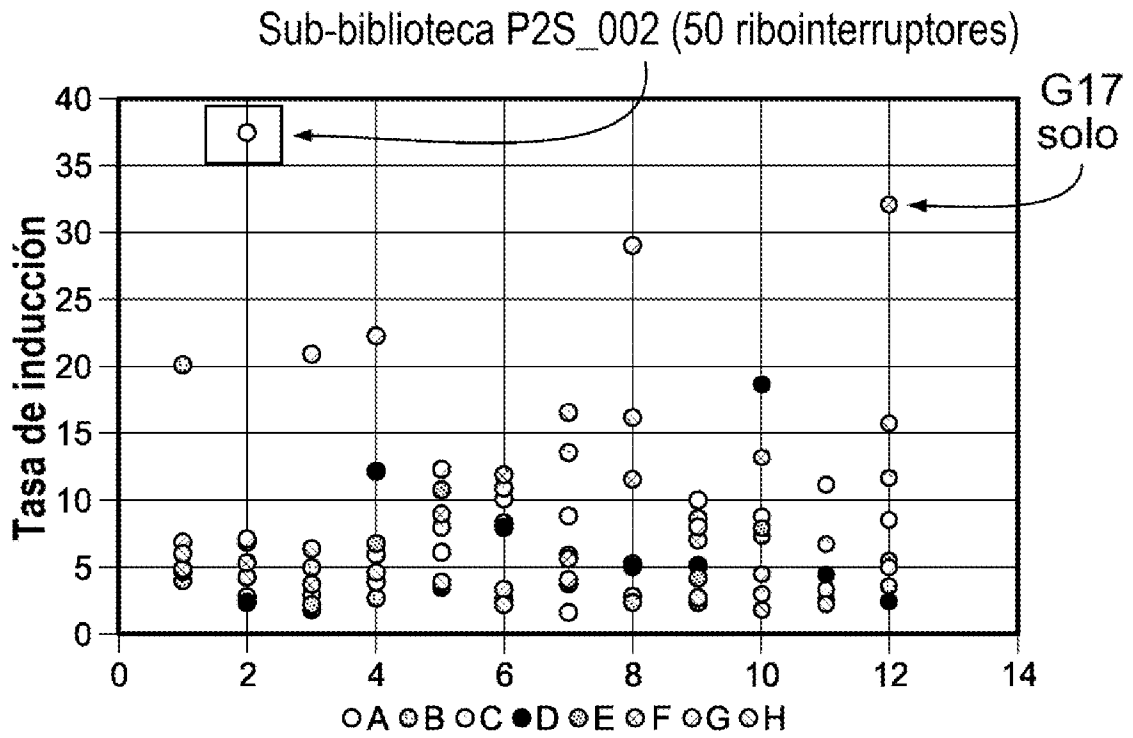
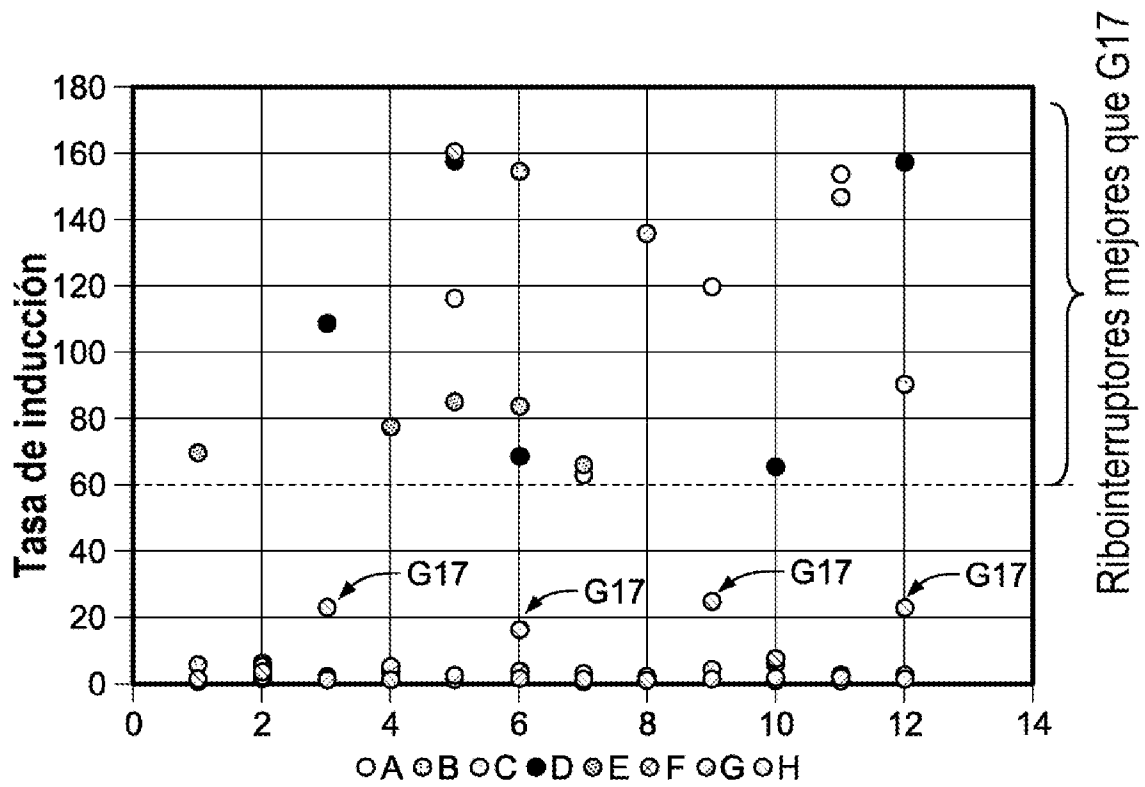


FIG. 6b



Sub-bibliotecas de ribointerruptores

FIG. 6c



Ribointerruptor individual de la sub-biblioteca P2S\_002

FIG. 6d

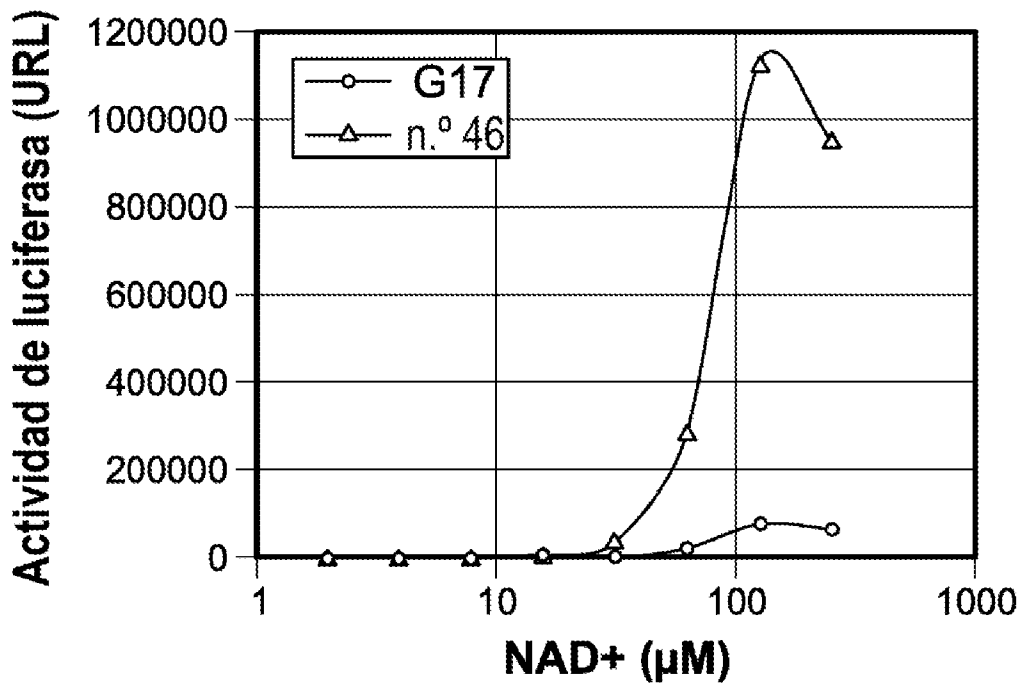


FIG. 6e

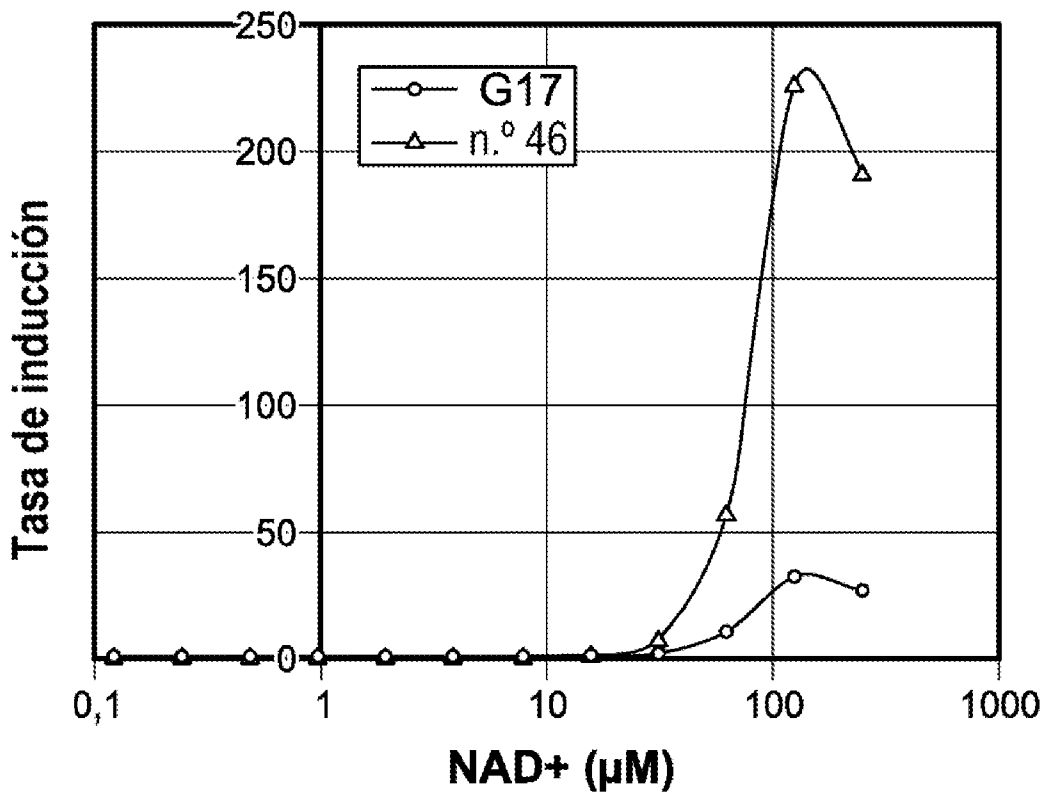


FIG. 6f