

Selección y caracterización de aptámeros de DNA frente a la IgG de ratón.

Cristina Coscolín^{1, a}, Alfonso Esteban-Lasso¹, Lucia Real¹, Alejandro García-Nafra¹, Cristina Martínez-Toledo¹, Leire Fernández-Crippa², Ignacio Antona-Palacios², Elena Vuelta², Ignacio García-Tuñón^{2, 3}, Miguel Ángel Ortega^{3, 4}, Mar Royuela^{2, 3}, M Val Toledo-Lobo², José Casas-Martín¹

1. Inari Biotech SL. 2. Dpto. Biomedicina y Biotecnología UAH. 3. IRICYS grupo de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa. 4. Dpto. Medicina y Especialidades Médicas UAH.

a. inaribiotech@gmail.com

XI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2026.

XX Simposio de Dianas Terapéuticas.

16 a 18 de marzo, 2026. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España.

Palabras clave: aptámeros, SELEX, IgG murina, NGS, G-cuádruplex

Resumen

Las inmunoglobulinas son dianas de gran interés para el desarrollo de aptámeros por sus múltiples aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, pero la obtención de ligandos frente a IgG con alta afinidad y especificidad sigue siendo un reto. En este trabajo se abordó la selección de aptámeros de ADN frente a IgG de ratón mediante una estrategia SELEX optimizada. Para ello, se empleó una mezcla de IgG murinas nativas (IgG1, IgG2a e IgG2b) inmovilizadas en partículas magnéticas carboxiladas, con contraselección frente a otras IgG y fragmentos F(ab')₂, y un esquema de selección con condiciones progresivamente más estrictas. El seguimiento por qPCR y curvas de melting mostró una disminución de la heterogeneidad poblacional y un desplazamiento de la T_m hacia 80 °C, patrón compatible con enriquecimiento en secuencias más estables; con base en ello se secuenciaron por NGS rondas intermedias y finales. El análisis bioinformático permitió identificar familias enriquecidas y priorizar candidatos, de los que varios mostraron contenido GC elevado, estructuras secundarias estables (ΔG entre -10.5 y -19.70 kcal/mol), potencial para formar motivos G-cuádruplex y valores de K_d en el rango nanomolar bajo. En conjunto, los resultados indican que la estrategia empleada permite superar las limitaciones de aproximaciones previas y obtener aptámeros frente a IgG de ratón con propiedades prometedoras para su aplicación como ligandos alternativos en ensayos de inmunodetección.

Cita: Coscolín, Cristina; Esteban-Lasso, Alfonso; Real, Lucia; García-Nafra, Alejandro; Martínez-Toledo, Cristina; Fernández-Crippa, Leire; Antona-Palacios, Ignacio; Vuelta, Elena; García-Tuñón, Ignacio; Ortega, Miguel Ángel; Royuela, Mar; Toledo-Lobo, M Val; Casas-Martín, José (2026) Selección y caracterización de aptámeros de DNA frente a la IgG de ratón. Actas del XI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2026. XX Simposio de Dianas Terapéuticas. 16 a 18 de marzo, 2026. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. *dianas* 15 (1): e202603fp005. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202603fp005 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202603fp005>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Coscolín C, Esteban-Lasso A, Real L, García-Nafra A, Martínez-Toledo C, Fernández-Crippa L, Antona-Palacios I, Vuelta E, García-Tuñón I, Ortega M, Royuela M, Toledo-Lobo MV, Casas-Martín J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Los aptámeros son secuencias de RNA o DNA monocatenarios, seleccionados y sintetizados por su capacidad para reconocer moléculas diana de forma estable, específica y con alta afinidad [1, 2]. Su obtención se basa en el método SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), un proceso iterativo de selección y amplificación que enriquece progresivamente las secuencias con mayor capacidad de unión a la diana. En esencia, los aptámeros son moléculas que adoptan estructuras tridimensionales únicas en condiciones específicas de temperatura, pH y salinidad, lo que les permite unirse a sus moléculas diana, e incluso interferir con su función biológica [2].

Dentro de las dianas proteicas, las inmunoglobulinas han despertado un especial interés por su relevancia biológica, diagnóstica y terapéutica. Se han desarrollado aptámeros frente a IgE humana, debido a su implicación en la etiopatogenia de las enfermedades alérgicas, con el objetivo de emplearlos en el tratamiento de las reacciones alérgicas bloqueando los receptores frente a la Fc de la IgE y/o por su potencial utilidad diagnóstica, cuantificando los niveles de IgE en fluidos humanos [3]. Estos aptámeros presentan una excelente afinidad, con valores de K_d (constante de disociación) de 30 nM para el aptámero de RNA y 10 nM para el aptámero de DNA [3]. Asimismo, se han desarrollado aptámeros frente a la IgG humana [4, 5] y la IgG de ratón [6]; sin embargo, los resultados descritos indican un rendimiento inferior en términos

de afinidad y especificidad con respecto a otros aptámeros, como los mencionados frente a la IgE. La obtención de aptámeros realmente eficientes contra la IgG continúa siendo un desafío: la naturaleza modular de las inmunoglobulinas, junto con su complejidad estructural y la presencia de regiones conservadas e hipervariables, dificulta la selección de ligandos que combinen una elevada afinidad con una alta especificidad y estabilidad. En este trabajo desarrollamos y caracterizamos aptámeros de DNA frente a la IgG de ratón empleando estrategias metodológicas optimizadas orientadas a mejorar el enriquecimiento de secuencias funcionales, con el objetivo de disponer de ligandos alternativos aplicables en ensayos de inmunodetección.

Material y métodos

Como primera aproximación, se sintetizaron cuatro variantes derivadas de secuencias de aptámeros frente a la IgG de ratón descritas en estudios previos [6], conjugadas a digoxigenina (dos idénticas a las secuencias publicadas y dos versiones truncadas), para su evaluación en ensayos de inmunodetección.

Para desarrollar nuevos aptámeros, se empleó como diana principal una mezcla de IgG murinas completas y nativas purificadas (mezcla equimolar de IgG1/IgG2a/IgG2b). Para la selección negativa se emplearon IgG de conejo, humana y de rata, así como fragmentos F(ab')₂ para eliminar secuencias con afinidad por la región Fab. La población inicial fue una librería ssDNA denominada RND40. Esta librería contiene una región central aleatoria de 40 nucleótidos, flanqueada por dos regiones constantes de 18 nucleótidos destinadas a la unión de cebadores (5'-GCGGATGAAGACTGGTCT-40N-GTTGCTCGTATTTAGGGC-3'). El tampón general fue PBS suplementado con 1 mM de MgCl₂ (PBS-Mg), modificado en algunas rondas con aditivos para aumentar la astringencia.

Las inmunoglobulinas se inmovilizaron covalentemente sobre partículas magnéticas Dynabeads MyOne carboxiladas (Invitrogen, 1 µm) mediante activación con EDC (con o sin NHS). Antes de iniciar la selección se realizó una contraselección frente a partículas magnéticas recubiertas con BSA para reducir uniones inespecíficas al soporte.

Se aplicó un esquema de SELEX rápido inspirado en conceptos de los métodos “no-selex” y “selex rápido”, combinando incubación inicial prolongada y lavados extensos, con amplificación solo cuando procedía según la cuantificación del DNA remanente/no unido. En la ronda 1 se incubó la librería con la diana en PBS-Mg + 0,01% Tween-20 a un ratio proteína:aptámero 1:4, seguida de un ciclo inicial de lavados de 24 h; se estimó el DNA remanente en sobrenadante (≈70% del inicial). La fracción unida se amplificó sin disociar previamente las partículas magnéticas (las partículas se retiraron del producto de PCR con imán). En la ronda 2 se redujo la incubación a 1 h y se aplicaron 3 lavados de 15 min; en rondas sucesivas se incrementó la astringencia reduciendo tiempos de incubación, aumentando número/duración de lavados y elevando el ratio proteína:aptámero (hasta 1:10 a partir de la ronda 5). Se incorporó dextrán sulfato como competidor polianiónico en los lavados (de 2 a 5 mM) para favorecer la selección de secuencias con cinética de disociación lenta.

Tras cada ronda, el DNA unido se recuperó mediante PCR y se generó ssDNA por digestión con λ-exonucleasa a partir de un amplicón con el cebador correspondiente fosforilado. Para mejorar el rendimiento de la digestión, se empleó un cebador con marcaje 5'-Cy3 en la cadena F, lo que además permitió una potencial monitorización por fluorescencia. La cuantificación de ssDNA se realizó por NanoDrop, Qubit y densitometría en gel (ImageJ), empleándose la densitometría como aproximación más consistente.

El enriquecimiento se monitorizó por qPCR y curvas de melting. La secuenciación se realizó por NGS. Se usaron los programas AptaSUITE y FASTAptamer para el cribado de las secuencias y QGRS Mapper y mFold para analizar las características de los candidatos más prometedores. La estructura tridimensional se modeló usando el software Chimera.

Resultados

Ninguna de las secuencias sintetizadas frente a la IgG de ratón, basadas en estudios previos [6], mostró utilidad experimental en inmunocitoquímica, inmunohistoquímica o Western blot, ya que no se detectó señal compatible con la unión a los anticuerpos primarios evaluados. En conclusión, no se evidenció interacción aptámero-diana en las condiciones ensayadas.

En consecuencia, se procedió a la selección de nuevos aptámeros frente a las dianas. El análisis de las curvas de melting evidenció una disminución progresiva de la heterogeneidad poblacional y un desplazamiento significativo de la T_m hacia 80 °C. En las rondas iniciales se observaron picos a 68 °C y 75 °C, mientras que en las rondas finales apareció un nuevo pico a 80 °C, cuya intensidad aumentó en la última ronda a medida que desaparecía el pico de 75 °C (Figura 1). Este desplazamiento sugiere un enriquecimiento en secuencias con mayor contenido en GC (>40 %), asociado a mayor estabilidad estructural y, potencialmente, a una mayor afinidad. Con base en estos resultados, se secuenciaron por NGS las dos últimas rondas y dos rondas intermedias. Como control positivo del patrón esperado, se empleó un

aptámero previamente desarrollado frente a otra diana, cuyo pico de melting se sitúa a 80 °C, coherente con la región de T_m en la que se concentraron las rondas finales seleccionadas para secuenciación. Las rondas intermedias se incluyeron para recuperar y comparar las secuencias asociadas a los picos de 68 ° y 75 °C con las mismas secuencias presentes en las rondas finales, y descartar dichos aptámeros no enriquecidos durante el proceso de análisis de datos.

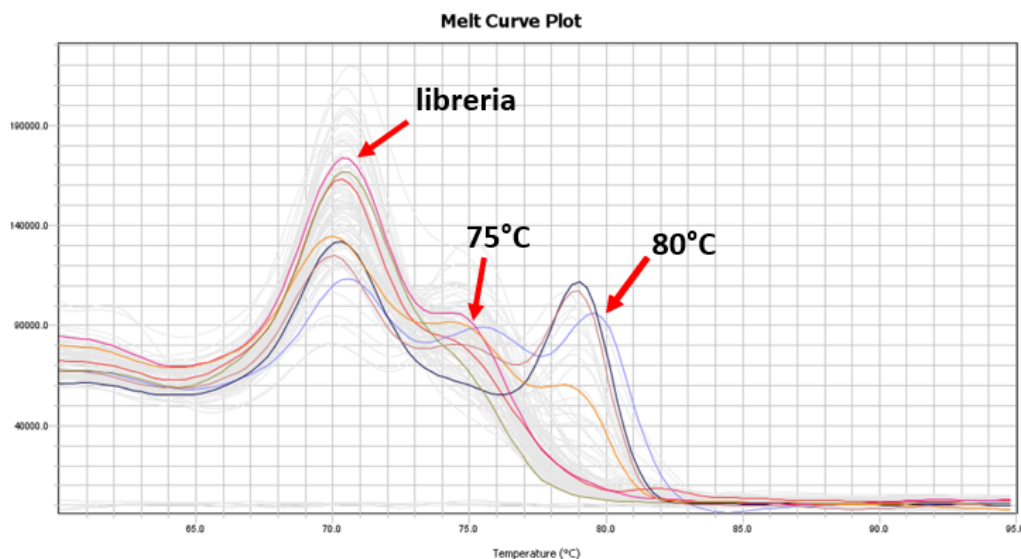


Figura 1. Curvas de melting de las poblaciones de aptámeros durante la selección. Se observa un desplazamiento progresivo de la T_m desde un pico inicial correspondiente a la librería (en torno a 68–70 °C) y un pico adicional a 75 °C, hacia un pico predominante a 80 °C en las rondas finales.

Los archivos resultantes de la secuenciación se analizaron para evaluar la evolución de las poblaciones de aptámeros a lo largo del proceso de selección. El análisis se llevó a cabo con RStudio y PyCharm, con el fin de ordenar las secuencias por abundancia y aplicar un cribado de calidad previo al alineamiento. Las secuencias se ordenaron y se reorientaron a sentido forward, y se realizó un cribado para eliminar secuencias artefactuales, como duplicidades, concatámeros de cebadores y otras secuencias no representativas. Adicionalmente, se efectuó una comparación entre rondas intermedias y rondas finales para descartar familias que no mostraran enriquecimiento a lo largo de la selección. Tras este primer filtrado, se empleó un script personalizado en Python para alinear las secuencias y cuantificar las similitudes intra- e inter-poblacionales entre rondas. Las secuencias de cada ronda se agruparon por similitud, identificando clústeres con alta similitud intra-grupo y baja similitud inter-grupo, conservados a lo largo de la selección, lo que permitió inferir qué familias se estaban enriqueciendo (y cuáles podrían estar asociadas a una mayor afinidad por la diana). Este enfoque, basado en clustering y comparación longitudinal entre rondas, permitió detectar secuencias convergentes y priorizar las candidatas más prometedoras.

Como parte de la caracterización estructural, se calculó la riqueza en GC (%GC) de los candidatos priorizados (11R8: 38.7%, 69R8: 48.1%, 18R8: 51.4%) y se empleó QGRS Mapper para evaluar la capacidad potencial de las secuencias para adoptar motivos G-cuádruplex, en coherencia con el enriquecimiento observado en guaninas. De forma complementaria, los aptámeros seleccionados se analizaron con mFold para predecir las estructuras secundarias más estables (menor energía libre), obteniéndose valores de ΔG de -10.5 kcal/mol (11R8), -19.70 kcal/mol (69R8) y -17.3 kcal/mol (18R8) (Figura 2). Se estimaron los valores de K_d de los aptámeros seleccionados, que se situaron en el rango nanomolar bajo. Finalmente se estimaron las estructuras secundarias y terciarias de los mejores aptámeros (Figura 2) con el objetivo de analizar, mediante docking, las características de la unión aptámero-IgG.

Discusión

En la selección realizada se utilizaron como dianas inmunoglobulinas completas, purificadas de sueros de ratones (IgG1, IgG2a e IgG2b). Nuestra hipótesis fue que, al realizar unas primeras rondas de selección con dianas múltiples, podríamos obtener una subpoblación de aptámeros enriquecida frente a IgGs, que posteriormente se emplearía como sub-librería para realizar las selecciones correspondientes a las dianas específicas (aptámeros isotipo/subclase-específicos), para obtener aptámeros con capacidad para unirse a las tres subclases de IgG de interés (aptámeros polivalentes frente a IgG murina). Este método es una adaptación de los métodos conocidos como “Toggle-Selext” y “Target-Switch Selext”, con los que pueden obtenerse aptámeros con reactividad tanto específica inter-especie como cruzada intra- como inter-especie, alternando entre dos o más dianas en rondas consecutivas [6, 7, 8].

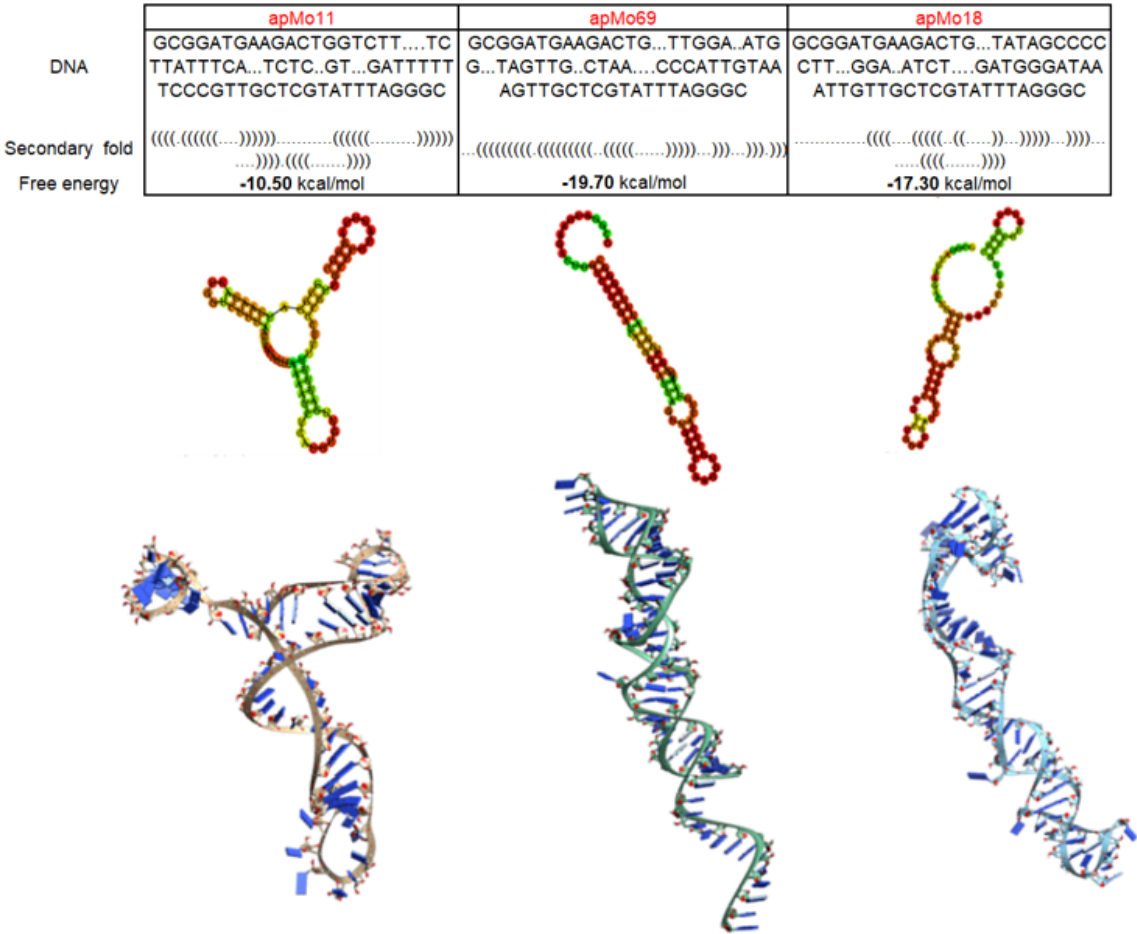


Figura 2. Secuencias, estructura secundaria, energía libre y modelos estructurales 2D/3D de los aptámeros seleccionados con mejor desempeño (11R8, 69R8 y 18R8). Se muestran la secuencia de ADN, el patrón de plegamiento secundario y el valor de energía libre (kcal/mol) para cada aptámero. Por motivos de patentabilidad/protección de la propiedad intelectual, no se muestran las secuencias completas de los aptámeros en este manuscrito.

Se han realizado esfuerzos para generar aptámeros frente a inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG e IgE) por sus posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. En este sentido, se han seleccionado aptámeros para la detección de sIgA (para identificar infecciones del tracto respiratorio superior), para el reconocimiento de células cancerosas mediante IgM de membrana, para aplicaciones relacionadas con reacciones hemolíticas transfusionales y enfermedades autoinmunes mediadas por IgG, y para la detección de IgE en enfermedades alérgicas [9]. Hasta la fecha, los aptámeros frente a IgG desarrollados han mostrado, en su conjunto, baja afinidad y una limitada especificidad, por ejemplo, el aptámero de RNA frente a la región Fc de IgG humana desarrollado por Miyakawa y cols. [4] presentó una Kd de 117 nM. En cambio, los aptámeros desarrollados frente a IgE presentan valores de Kd en el rango nanomolar bajo [3], comparables a los obtenidos en este trabajo para los aptámeros frente a la IgG de ratón.

En 2013, Ma y cols. [6] publicaron la secuencia de un aptámero de DNA frente a la región Fc de la IgG de ratón. Dicho estudio proponía un procedimiento basado en la exposición secuencial a múltiples dianas durante ocho rondas de SELEX. A diferencia del SELEX clásico, en el que se seleccionan secuencias frente a una diana concreta mediante rondas sucesivas con condiciones progresivamente más restrictivas, el método de Ma y cols. empleó de forma secuencial múltiples dianas (IgG1, IgG2a, Fc de IgG de ratón y anti-HBs IgG). Este enfoque pretendía obtener un aptámero con capacidad de unión amplia a diferentes subclases de IgG; sin embargo, el resultado fue un aptámero con baja afinidad (Kd ≈ 1 μM), cuya unión tuvo que demostrarse mediante marcaje radiactivo. Nuestro equipo sintetizó cuatro variantes basadas en las secuencias propuestas [6], y ninguna mostró utilidad como sustituto de anticuerpos secundarios en inmunocitoquímica, inmunohistoquímica o Western blot, ya que no se detectó señal que evidenciara unión a los anticuerpos primarios evaluados. En otros estudios [10], tampoco se detectó unión aptámero-diana usando las secuencias publicadas de este aptámero frente a IgG de ratón. En conjunto, nuestros resultados y los de Schmidt y cols. [10] sugieren que el aptámero publicado presenta una afinidad insuficiente para aplicaciones prácticas, o incluso una capacidad de unión no reproducible en condiciones no radiactivas. En este contexto, los resultados presentados en este trabajo contribuyen a cubrir este vacío, mediante aptámeros frente a IgG de ratón con comportamiento robusto, validado y reproducible.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por una ayuda de colaboración público-privada del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación-Next Generation EU, concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CPP2022-009959). Los autores agradecen el apoyo recibido para el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

1. Yang LF, Ling M, Kacherovsky N, Pun SH. Aptamers 101: aptamer discovery and in vitro applications in biosensors and separations. *Chemical Science*, 14(19): 4993–5018 (2023).
2. Didarian R, Ozbek HK, Ozalp VC, Erel O, Yildirim-Tirgil N. Enhanced SELEX Platforms for Aptamer Selection with Improved Characteristics: A Review. *Molecular Biotechnology*, 67(8): 2962–2977 (2025).
3. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J. Immunol*; 157: 221–230 (1996).
4. Miyakawa S, Nomura Y, Sakamoto T, Yamaguchi Y, Kato K, Yamazaki S, Nakamura Y. Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. *RNA*; 14: 1154–1163 (2008).
5. Inomata E, Tashiro E, Miyakawa S, Nakamura Y, Akita K. Alkaline-tolerant RNA aptamers useful to purify acid-sensitive antibodies in neutral conditions. *Biochimie*; 145: 113–124 (2018).
6. Ma J, Wang MG, Mao AH, Zeng JY, Liu YQ, Wang XQ, Ma J, Tian YJ, Ma N, Yang N, Wang L, Liao SQ. Target replacement strategy for selection of DNA aptamers against the Fc region of mouse IgG. *Genet Mol Res*; 12(2): 1399–1410 (2013).
7. White RR, Rusconi CP, Scardino E, Wolberg AS, Lawson JH, Hoffman M, Sullenger BA. Generation of species cross-reactive aptamers using “toggle” SELEX. *Molecular Therapy*, 4(6): 567–573 (2001).
8. Cutts ZW, Hong JM, Shao S, Tran A, Dimon M, Berndt M, Wu D, Pawlosky A. Target-switch SELEX: Screening with alternating targets to generate aptamers to conserved terminal dipeptides. *STAR Protocols*, 3(4): 101724. (2022).
9. Bogner Z, Gyurcsányi RE, Meszaros T. Aptamers against Immunoglobulins: Design, Selection and Bioanalytical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16): 5748 (2020).
10. Schmidt C, Kammel A, Tanner JA, Kinghorn AB, Khan MM, Lehmann W, Menger M, Schedler U, Schierack P, Rödiger S. A multiparametric fluorescence assay for screening aptamer-protein interactions based on microbeads. *Scientific Reports*; 12:2961 (2022).